

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

**Vliv způsobu přípravy mechového materiálu na jeho  
využitelnost při biomonitoringu znečištění nanočásticemi  
oxidů kovů**

**Effect of moss material preparation on its applicability in metal  
oxide nanoparticles biomonitoring**

**Autor:**

Lenka Bardoňová

**Vedoucí bakalářské práce:**

Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.

**Datum odevzdání bakalářské práce:**

15.5.2017

## Zadání bakalářské práce

Student: **Lenka Bardoňová**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: Vliv způsobu přípravy mechového materiálu na jeho využitelnost při biomonitoringu znečištění nanočásticemi oxidů kovů  
Effect of moss material preparation on its applicability in metal oxide nanoparticles biomonitoring

Jazyk vypracování: čeština

### Zásady pro vypracování:

Se vzrůstající produkcí nanomateriálů vzrůstá i pravděpodobnost jejich úniku do životního prostředí, nanočástice oxidů kovů přitom patří mezi nejrozšířenější. Jednou z možností monitoringu znečištění životního prostředí je biomonitoring, přičemž mechorosty jsou rostlinami v rámci biomonitoringu nejvíce používanými. Cílem bakalářské práce je zjištění, jak různé způsoby přípravy vzorků mechu *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. ovlivňují koncentraci akumulovaných nanočástic oxidu zinečnatého v různých částech jeho stélky a pomocí zhodnocení narušení plazmatických membrán zjistit, jaký vliv mají jednotlivé způsoby úpravy na využitelnost tohoto mechu v biomonitoringu znečištění nanočásticemi oxidů kovů.

Studentka se v průběhu práce zaměří na:

- 1) Literární rešerši odborných textů se zaměřením na problematiku vlivu nanočástic na rostliny a možnosti biomonitoringu znečištění nanočásticemi pomocí rostlin včetně vlivů, které na výsledek biomonitoringu může mít způsob přípravy exponovaných vzorků.
- 2) Sběr a přípravu vzorků mechorostu *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. pro laboratorní experimenty.
- 3) Expozici vzorků suspenzí nano-ZnO o známých koncentracích v kombinaci s různými způsoby úpravy vzorku
- 4) Stanovení množství akumulovaného nano-ZnO a jeho lokalizace ve stélce mechu (povrch mechu, vnitrobuněčný a mezibuněčný prostor) pomocí metody sekvenčního vymývání.
- 5) Zhodnocení získaných výsledků vzhledem k metodice biomonitoringu, jejího využití a případné modifikace pro monitoring znečištění nanočásticemi za pomoci statistické analýzy získaných výsledků v programu R.

### Seznam doporučené odborné literatury:

CHAKRABORTTY, S. a PARATKAR, G.T., 2006: Biomonitoring of trace element air pollution using mosses.-Aerosol and Air Quality Research, 3:247-258.

KAHRU, A., DUBOURGUIER, H.-C., 2010, From exotoxicology to nanoecotoxicology.-Toxicology, 269: 105-119.

MARKERT, B. A., A. M. BREURE a Harald G. ZECHMEISTER (eds.). 2003. Bioindicators: principles, concepts and applications. 1st ed. Amsterdam: Elsevier. Trace metals and other contaminants in the environment, vol. 6. ISBN 00-804-4177-7.

PÉREZ-LLAMAZARES, A. 2011. The sequential elution technique applied to cryptogams: a literature review. *Journal of Bryology*. 33(4), 267-278.

PÉREZ-LLAMAZARES, A., C.J. GALBÁN-MALAGÓN, J.R. ABOAL, J.A. FERNÁNDEZ, a A. CARBALLEIRA. 2010. Evaluation of cations and chelating agents as extracellular extractants for Cu, Pb, V a Zn in the sequential elution technique applied to theterrestrial moss *Pseudoscleropodium purum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73(4), 507-514.

SIDDIQUI, Manzer H., Mohammed H. AL-WHAIBI a Firoz MOHAMMAD (eds.). 2015. Nanotechnology and plant sciences. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 303 s. ISBN 978-331-9145-013.


WOLTERBEEK, B., 2002: Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives.-*Environmental Pollution*, 120:11-21.

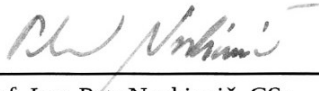
Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.**

Datum zadání: 20.10.2016

Datum odevzdání: 15.05.2017

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.  
vedoucí katedry

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Petr Noskovič, CSc.  
prorektor pro studium



Prohlašuji, že:

- Celou bakalářskou práci včetně příloh jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu. Byla jsem seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB-TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 ods. 3).
- Souhlasím s tím, že bakalářská práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB-TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci, nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněná v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 15. 5. 2017

Podpis: .....

Jméno a příjmení autora práce: Lenka Bardoňová

Adresa trvalého pobytu autora práce: Komenského 32, Suchbátka nad Odrou, 742 01

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především Mgr. Oldřichu Motykovi, PhD. za vedení bakalářské práce, neocenitelné rady a věcné připomínky. Dále mé poděkování patří oddělení anorganické analýzy Centra nanotechnologií VŠB-TUO, jmenovitě Ing. Šárce Tomisové, Ing. Martině Mirošové a Evě Kelnarové, za provedení analýz velkého množství vzorků a prof. Ing. Janě Seidlerové, CSc., která celý tento projekt zaštitovala.

## Abstrakt

Tato práce je zaměřena na určení vlivu úpravy mechového materiálu na akumulaci nanočástic ZnO a porušení buněčných membrán. Vzorky mechu druhu *Pleurozium schreberi* Brid. Mitt. nasbírané v neznečištěné oblasti byly v laboratoři podrobeny různým úpravám a exponovány nanočásticím. Metodou sekvenční extrakce byla získána koncentrace Zn a K ve čtyřech částech stélky – na povrchu, v extracelulární, intracelulární frakci a ve zbytkovém materiálu. Pomocí poměru koncentrace K vně a uvnitř buňky bylo zhodnoceno narušení buněčných membrán.

Bylo zjištěno, že umytí mechu pod kohoutkovou vodou, pravidelné vlhčení a sušení vzorků v sušárně při teplotě 50 °C negativně ovlivňuje integritu buněčných membrán, a proto není vhodné takto upravovat mechy pro biomonitoring znečištění nanočásticemi.

**Klíčová slova:** nanočástice, mechorosty, ZnO, biomonitoring, bryomonitoring

## Abstract

Aim of this bachelor thesis was to find the impact of different preparation of moss samples on the ZnO nanoparticles accumulation and cell membranes disruption. *Pleurozium schreberi* Brid. Mitt. moss samples were gathered, treated in various ways under laboratory conditions and exposed to ZnO nanoparticles. Sequential elution technique was used to determine the concentration of Zn and K in four parts of the thallus – on the surface, in extracellular and intracellular spaces and in the residual material. Cell membrane disruption was evaluated by K concentration ratio inside/outside the cell.

It was discovered that washing the moss in tap water, regular wetting and placing the samples into dryer at temperature 50 °C negatively affects cell membranes integrity. Thus, it is not recommended to use these treatments to prepare samples used in nanoparticles biomonitoring.

**Keywords:** nanoparticles, bryophytes, ZnO, biomonitoring, bryomonitoring

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| Seznam použitých zkratk a symbolů .....                      | 8  |
| 1. Úvod .....  | 9  |
| 2. Mechorosty .....  | 9  |
| 2.1. Vztah k ostatním rostlinám .....                        | 9  |
| 2.2. Hydratace .....   | 10 |
| 2.3. Živiny .....  | 11 |
| 2.4. Cizorodé látky a těžké kovy .....                       | 12 |
| 3. Příjem a transport nanočástic rostlinou .....             | 13 |
| 3.1. Mechorosty .....  | 13 |
| 3.2. Cévnaté rostliny – příjem .....                         | 14 |
| 3.3. Cévnaté rostliny – transport, přeměna a akumulace ..... | 19 |
| 4. Biomonitoring .....                                       | 22 |
| 4.1. Bryomonitoring .....                                    | 23 |
| 5. Metoda sekvenční extrakce .....                           | 24 |
| 5.1. Výběr činidla .....                                     | 25 |
| 6. Praktická část .....                                      | 26 |
| 6.1. Sběr a příprava vzorků .....                            | 26 |
| 6.2. Příprava suspenze ZnO a expozice .....                  | 27 |
| 6.3. Extrakce a analýza .....                                | 28 |
| 7. Výsledky .....  | 29 |
| 7.1. Zinek .....   | 30 |
| 7.2. Draslík .....   | 37 |
| 8. Diskuze .....   | 42 |
| 9. Závěr .....   | 45 |
| Bibliografie .....   | 47 |

## Seznam použitých zkratek a symbolů

|                         |   |
|-------------------------|---|
| AAS                     | atomová absorpční spektrometrie                     |
| ATP                     | adenosintrifosfát                                   |
| DEMI voda               | demineralizovaná voda                               |
| DNA                     | deoxyribonukleová kyselina                          |
| EDTA                    | ethylendiamintetraoctová kyselina                   |
| <i>H. cupressiforme</i> | <i>Hypnum cupressiforme</i> (Hedw.)                 |
| CHKO                    | chráněná krajinná oblast                            |
| ICP-AES                 | spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem          |
| <i>P. patens</i>        | <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp |
| <i>P. purum</i>         | <i>Pseudoscleropodium purum</i> (Hedw.) Fleisch     |
| <i>P. schreberi</i>     | <i>Pleurozium schreberi</i> Brid. Mitt.             |
| RNS                     | reaktivní formy dusíku                              |
| ROS                     | reaktivní formy kyslíku                             |
| RTG                     | rentgen   |
| SET                     | metoda sekvenční extrakce                           |
| UV                      | ultrafialový  |



## 1. Úvod

V posledních letech zaznamenaly nanotechnologie obrovský rozmach, s čímž souvisí i zvýšená výroba nanomateriálů, přičemž mezi nejvíce vyráběné materiály patří nanočástice oxidů kovů. S rozsáhlou produkcí (nejen) nanomateriálů je také nutně spjat jejich únik do životního prostředí, ať už při jejich výrobě nebo degradací aplikovaného výrobku. Nanočástice z definice nepřesahují velikost 100 nm a jejich chování a vlastnosti se často velmi liší od chování materiálů stejného chemického složení a klasické velikosti (bulk). Tento rozdíl je zapříčiněn především velkým poměrem povrchu ku objemu, díky čemuž jsou nanočástice mnohem reaktivnější než bulk materiály a mohou jednodušeji proniknout do různých částí zemské biosféry, nebo mohou vytvářet agregáty a přijít o vlastnosti nanočástic. Nelze tedy s úplnou jistotou předvídat, jak se určité nanočástice budou chovat v životním prostředí nebo např. v lidském těle. Mnoho vědců se již zabývá vlivem nanočástic a jiných nanomateriálů na lidský organismus nebo části ekosystémů, které hrají důležitou roli v potravním řetězci. Nicméně, aby takovéto výzkumy byly aplikovatelné, je nutné vědět, zda a kolik nanočástic se v životním prostředí opravdu vyskytuje. Jako jedna z možností se nabízí biomonitoring s využitím mechorostů – bryomonitoring. Tato metoda sledování znečištění (především) atmosféry je relativně přístrojově a metodicky nenáročná, levná a již v minulosti bylo ukázáno, že mechorosty úspěšně absorbují nanočástice do své stélky. Má práce si klade za cíl zjistit, jaká laboratorní příprava vzorků mechorostů pro expozici v životním prostředí povede k nejefektivnější příjmu nanočástic, aby zároveň rostlinky při této přípravě a expozici utrpěly co nejmenší poškození buněk.

## 2. Mechorosty

Mechorosty (Bryophytes) patří do říše rostlin a podříše vyšší rostliny. Dále jsou rozděleny do tří oddělení: játrovky (Marchantiophyta), mechy (Bryophyta) a hlevíky (Anthocerotophyta). (Glime, 2013; Váňa, 2006) Mechorosty jsou druhou největší skupinou rostlin (co se počtu druhů týče), zahrnují 15 000–25 000 druhů a nacházejí se na každém kontinentu a v každé oblasti obyvatelné rostlinami. (Glime, 2013)

### 2.1. Vztah k ostatním rostlinám

Mechorosty patří mezi zelené rostliny a mezi jejich společné znaky patří přítomnost chlorofylu *a* a *b*, xantofylů (pigmenty) a karotenů (pomocná fotosyntetická barviva), produkty fotosyntézy se ukládají v podobě škrobu do plastidů, jejich buněčná stěna je tvořena celulózą a stavba chloroplastů je podobná cévnatým rostlinám. Na rozdíl od většiny

řas obsahují mechorosty flavonoidy (skupina pigmentů, které absorbují UV světlo). (Glime, 2013)

Mechy a játrovky jsou unikátní tím, že všechny vegetativní struktury, listy (nebo stélka), lodyžky a rhizoidy (pakořínky, přichytná vlákna – vláknité struktury, které ukotvují rostlinu) patří do haploidní (gametofyt) generace a mají pouze jeden soubor chromozomů, které určují jejich vzhled a funkci. Naopak u cévnatých rostlin jsou obdobné struktury diploidní (sporofyt) a gametofyty se v rámci fylogeneze neustále zmenšují. U mechorostů je sporofyt nerozvětvený a je na gametofytu zcela závislý. (Glime, 2013)

Další rozdíl mezi mechorosty a cévnatými rostlinami tkví v tom, že mechorosty postrádají přítomnost lignifikovaných (zdřevnatělých) cévních svazků, proto jsou označovány jako bezcévné rostliny. Sice stélka některých mechorostů může být tvořena diferencovanými pletivy (asimilační pletivo, diferenciace buněk v žeburu či lodyžce) a výše organizovaní zástupci mechů mohou mít i jednoduchá vodivá pletiva (cévní svazky), které jsou složena z podlouhlých, živých i mrtvých buněk, ale neobsahují lignin. U některých mechorostů byla zjištěna přítomnost leptoidů a hydroidů, které jsou obdobou floému (lýko) a xylému (dřevní cévní svazek). (Váňa, 2006)

## **2.2. Hydratace**

Absence sofistikovaného cévního vodivého systému limituje nebo zpomaluje pohyb vody v rostlince a chybějící kořeny, které jsou u většiny mechorostů nahrazeny necévnatými rhizoidy, ztěžují či zcela znemožňují získávání vody z půdy. Na druhou stranu mohou rhizoidy pomoci při obstarávání živin z většího objemu substrátu, jakož i při zpomalování procesu vysychání. (Glime, 2013)

Mechorosty jsou tedy závislé na získávání vody z atmosféry (déšť, mlha, rosa, kondenzace vlhkosti na některých orgánech), kterou přijímají celým povrchem těla. Podle způsobu vedení vody jsou mechorosty rozděleny na dvě skupiny – ektohydrikové a mixohydrikové. U ektohydrikových mechorostů je voda s živinami přijímána celým povrchem stélky a je okamžitě využitelná. Často je vedena vně a druhy patřící do této skupiny nemají žádné nebo nejvýše vysoce redukované systémy k vedení vody. Mixohydrikové druhy sice přijímají vodu celým povrchem těla, ale jsou schopny ji interně rozvádět. (Váňa, 2006)

Vnitřní transport vody probíhá třemi způsoby – v prostoru mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou (apoplasticky), pomocí plasmatických můstků ve ztenčeních mezi buňkami (symplasticky) nebo hydroidy (nejjednodušší způsob). Hydroidy vytvářejí

centrální svazek, který je obklopen stereidy, což jsou tlustostěnné, vláknité buňky, které zpevňují stonek. Hydroidy neobsahují lignin ani spirální zesílení, čímž se liší od cévic a cévnatých rostlin. Leptoidy, které vedou cukry, jsou uspořádány stejně jako u cévnatých rostlin – tedy obklopují buňky, které vedou vodu. Mechorosty často mají tenkou kutikulu (pokožku), ale u většiny druhů postrádá vosk. (Glime, 2013; Váňa, 2006)

V ekosystému mechorosty zadržují vodu a udržují vlhkost v půdě pod nimi. Vodu mohou pojmout až do 2,5–15násobku hmotnosti sušiny. K absorbování vody používají kapilární prostory. Mají také význačnou toleranci k vysychání, díky které přežívají, když je v ekosystému vody nedostatek. Některé druhy jsou schopny obnovit metabolismus již do několika hodin po rehydrataci. (Glime, 2013; Váňa, 2006)

Na rozdíl od mechorostů cévnaté rostliny používají k příjmu vody výhradně kořeny, vodu dále v lodyze a listech rozvádějí cévními svazky. (Váňa, 2006)

### **2.3. Živiny**

Mechorosty mohou přijímat živiny z 5 hlavních zdrojů: půda, voda, atmosférický prach, srážky a opad. Vyžadují stejné živiny jako cévnaté rostliny, ale v nižších koncentracích. Příjem živin ve vysokých koncentracích může dokonce rostlince uškodit. (Glime, 2013)

Mechorosty potřebují ve větší kvantitě makronutrienty – C, H, O, P, K, N, S, Mg, Ca, Fe. V buňkách jsou obsaženy v relativně stálé a vysoké koncentraci (Glime, 2013) a při jejich nedostatku dojde k omezení či potlačení růstu. (Váňa, 2006) Dusík a fosfor jsou nezbytné k výrobě proteinů a DNA. (Bates et al., 2000) Hořčík je potřebný pro syntézu chlorofylů a jako aktivátor několika enzymů, vyskytuje se v buňkách i vně buněk. Vápník se pouze zřídka vyskytuje v cytoplazmě (vnitřek buňky vyjma jádra), ale je součástí hmoty, která spojuje buněčné stěny. Pohyb vápníku je v rostlině omezený, akumuluje se tedy ve starších částech. (Bates, 1979; Váňa, 2006)

Příjem živin (stejně jako příjem vody) probíhá celým povrchem těla (primárně fyloidy), což je podporováno několika faktory: velkým poměrem povrchu ku objemu, nízkým odporem povrchu a tím, že fyloidy mohou mít do šířky pouze jednu buňku, tudíž každá buňka je okamžitě vystavena živinám. (Brown, 1982) Pohyb živin a prvků v mechorostu probíhá stejnými způsoby jako pohyb vody.

Živiny mohou být na a v rostlině nalezeny v různých podobách:

- částice zachycené na listech

- rozpuštěny vně a ve hmotě buněčné stěny
- jako ionty vázané kationtovou výměnou, cheláty a na plazmatických membránách
- rozpuštěny v cytoplazmě a vakuolách
- jako nerozpustné látky v cytoplazmě a vakuolách
- v leptomu (leptoidech) (Glime, 2013)

Prvky a živiny zachycené na listech nebo v mezibuněčném prostoru mohou být jednoduše vymyty nebo odstraněny mechanickým procesem. (Markert et al., 2003)

#### 2.4. Cizorodé látky a těžké kovy

Existuje mnoho definic těžkých kovů opírající se o různé vlastnosti kovů (protonové číslo, toxicita, hustota). Protokol o těžkých kovech, který je součástí Úmluvy o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice států, uvádí, že termín těžké kovy znamená „kovy, nebo v jistých případech metaloidy, které jsou stabilní a mají měrnou hmotnost vyšší než  $4,5 \text{ g.cm}^{-3}$ , a jejich sloučeniny“. (Evropský monitorovací a hodnotící program, 1979) Patří mezi ně například měď, kadmium, rtuť nebo olovo.

Těžké kovy se do životního prostředí dostávají jak z přírodních, tak z antropogenních zdrojů. Mezi přírodní zdroje se řadí například sopečné erupce, kosmický a pozemní prach, požáry, solná mlha z oceánů. Antropogenní zdroje zahrnují emise z různých průmyslových závodů (metalurgie, hutě, slévárny, spalování) a dopravní ruch. Těžké kovy vstupují do atmosféry a různých ekosystémů, kde cirkulují. Mohou se akumulovat v půdě a živých organismech, což může mít drastický dopad na životní prostředí. (Markert et al., 2003)

Extracelulární příjem cizorodých látek závisí, v důsledku několika faktorů (velký specifický povrch, vysoká hodnota kationtové výměnné kapacity, nízký odpor povrchu, chybějící kutikula, některé fyloidy pouze jednu buňku široké (Šoltés a Gregušková, 2012)), pouze na povaze této látky bez ohledu na fyziologický stav rostliny. Naopak intracelulární příjem je ovlivněn několika aspekty rostlinného metabolismu. Je podmíněn například afinitou vhodného nosiče, konkurenčními prvky, gradientem v koncentraci prvků. Buněčná stěna funguje jako účinná ochrana proti průniku těžkých kovů. Pokud se však prvky do buňky dostanou, tak ovlivňují její metabolismus. (Markert et al., 2003)

U mixohydrického druhu *Polytrichum juniperinum* Hedw. bylo zjištěno, že iontové formy (např. sírany a olovo), jsou přemísťovány leptoidy, kdežto hydroidy slouží k přemísťování chelátových forem železa a olova. Ionty z povrchu mechorostu jsou schopny

apoplasticky projít dovnitř a leptoidy se poté chovají v podstatě jako bariéra mezi centrálním svazkem a kortexem. V důsledku toho se v leptoidích akumulují toxické ionty, které dále nejsou rozváděny do zbytku rostliny. Tento aktivní symplastický mechanismus kontroluje pohyb roztoků a těžkých kovů stejně jako endodermis kořene u cévnatých rostlin. (Trachtenberg a Zamski, 1978). Toto je možné jen u mixohydrických druhů mechorostů, které mají vyvinut systém hydroidů a leptoidů, u většiny mechorostů (ektohydrické) tento systém není možný.

### 3. Příjem a transport nanočástic rostlinou

Zatím neexistuje jednotná definice pojmu nanomateriál a nanočástice. Nanomateriál bývá nejčastěji definován jako materiál, jehož alespoň jeden vnější rozměr je menší než 100 nm. Nanočástice je malá část hmoty, která má vnější rozměr menší než 100 nm ve třech směrech. Nanomateriály mohou pocházet z několika zdrojů: přírodní, antropogenní cíleně vyrobené a antropogenní necíleně vyrobené (např. vedlejší produkt při sváření). (Dohnalová a Dohnal, 2015)

Příjem, pohyb a akumulace nanočástic v rostlině silně závisí na druhu rostliny a velikosti, typu, chemickém složení, funkcionalizaci a stabilitě nanočástice. (Rico et al., 2011)

#### 3.1. Mechorostry

Jako první na světě se příjmem nanočástic mechorosty zabývali Canivet et al. (2014). Použili mech druhu *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp a Fe nanočástice. Nanočástice byly pozorovány na povrchu fyloidů, se vzrůstající koncentrací použité suspenze přibývalo jejich množství. Nanočástice také pronikly dovnitř buněk, ale mechanismus penetrace zůstává neznámý.

Zeman (2015) se ve své práci zaměřil na příjem nanočástic ZnO mechem *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. Zjistil, že nanočástice pronikají i dovnitř stélky mechorostů a množství naakumulovaných nanočástic ZnO je silně závislé na době expozice. Mrázková (2016) došla k závěru, že částice se ukládají jak v extracelulárních, tak v intracelulárních prostorech.

Byl také zkoumán vliv Fe nanočástic o velikosti 20-80 nm na mech druhu *P. patens*. Nanočástice byly aplikovány v malých koncentracích (5 ng, 50 ng, 500 ng, 5 µg a 50 µg na rostlinu), aby dávky korespondovaly se situací v životním prostředí. Bylo potvrzeno, že

nanočástice pronikají do buněk, což by mohlo vyvolat nitrobuněčné poškození. Byla sledována nadprodukce ROS (Reactive Oxygen Species – reaktivní formy kyslíku) a RNS (Reactive Nitrogen Species – reaktivní formy dusíku) u vzorků s nejdelší dobou expozice a největšími dávkami nanočástic, ale bez poškození membrány. (Canivet et al., 2015) ROS se přirozeně vytváří v rostlinách v malých koncentracích a rostliny je zvládají úspěšně odbourávat. Jejich nadprodukce může být způsobena například obranou před patogeny, kdy ROS jsou toxické nejen pro patogeny, ale i rostlinnou buňku. Napomáhají vzniku nekrózy rostlinného pletiva, poškozují proteiny a DNA a narušují membrány a jejich funkčnost. (Bhattacharjee, 2005) Dle hladiny ATP nebyly nanočástice cytotoxické. (Canivet et al., 2015)

### **3.2. Cévnaté rostliny – příjem**

Obecně cévnaté rostliny přijímají živiny a jiné látky kořeny nebo přes nadzemní části – převážně listy (foliární nebo mimokořenová výživa). Listy jsou pokryty vrstvou kutikuly, která je tvořena kutinem, kutanem a kutikulárním voskem. Látky mohou do rostlin vstoupit přes stomata (průduchy) nebo přes kutikulu, která slouží jako ochrana listu před vypařováním vody a je také hlavní překážkou při vstupu různých látek do rostliny. Látky mohou přes kutikulu proniknout dvěma způsoby v závislosti na chemické podstatě přijímaných látek: lipofilní nebo polární cestou. Látky, které mají lipofilní charakter mohou difundovat kutikulou lipofilní cestou, kdy míra propustnosti kutikuly závisí na teplotě a rozpustnosti molekuly ve voskové vrstvě kutikuly. Polární iontové sloučeniny prostupují kutikulou přes kutikulární polární póry, které jsou vyplněné vodou. Tyto póry mohou mít různou velikost v závislosti na umístění a druhu rostliny, ale nejčastěji se jejich průměr pohybuje okolo 1 nm. Po překonání kutikulární bariéry vstupují živiny do volného prostoru (tzn. prostory buněčných stěn a mezibuněčné prostory). Z těchto prostor mohou látky difundovat hlouběji do listu, kde mohou být akumulovány nebo přemístěny do floémového toku a transportovány do jiných částí rostliny. (Trčková et al., 2009; Richter, 2003; Zhang et al., 2015)

Příjem nanočástic přes listy byl potvrzen např. aplikací CeO<sub>2</sub> nanočástic na listy kukuřice seté (*Zea mays*) ve formě aerosolu. Nanočástice byly listy absorbovány a nebylo je možno odstranit omytím listů, zároveň absorpce nanočástic nezávisela na tom, zda stomata byla otevřená nebo uzavřená. Nanočástice se v listech akumulovaly a nebyla sledována jejich přítomnost v dalších částech rostliny nebo nových listech, což znamená, že nedošlo k translokaci částic floémem. (Birbaum et al., 2010) Naopak transport CeO<sub>2</sub> nanočástic z listů do kořenů a jiných částí rostliny byl pozorován u okurky seté (*Cucumis sativus*).

(Hong et al., 2014) Larue et. al (2012) zjistili, že nanočástice  $\text{TiO}_2$  o velikosti 14 nebo 25 nm se po expozici na listy pšenice a řepky objevily i v nových listech (které nanočásticím vystaveny nebyly), tudíž k jejich transportu floémem dojít muselo. Další studie se zabývala foliární expozicí Ag nanočástic na rostlinu locika setá (*Lactuca sativa*). Nanočástice aglomerovaly na povrchu listů, byly zachyceny kutikulou a přes stomata pronikly do tkáně listů. Byly detekovány v epidermis, mezofylu<sup>1</sup> a vodivých pletivech – jak navázané na buněčné stěně, tak uvnitř buněk. Dále došlo k oxidaci Ag na  $\text{Ag}^+$  ionty, které vytvořily komplexy s thioley. Je možné, že neupravené Ag nanočástice se mohou přes kutikulu dostat polární cestou nebo mohou být oplášťeny kutikulárním voskem a při průniku přes kutikulu by byla využita spíše lipofilní cesta. (Larue et al., 2014)

Rozsáhlý výzkum podnikli Wang et al. (2013) s vodním melounem (*Citrullus lanatus*) a několika druhy nanočástic –  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$  a  $\text{MgO}$ . Vodní meloun byl vybrán, protože má relativně velká stomata a cévy, což může usnadnit příjem a transport nanočástic. Ve studii se zabývali vlivem způsobu foliární aplikace nanočástic a druhu (velikosti) nanočástic na průnik částic do listů a jejich transport do kořene a nových lístků. Porovnávali účinnost aplikace ve formě roztoku (kapky) nebo suchého aerosolu. Zjistili, že koncentrace nanočástic v rostlině je vyšší po aplikaci aerosolem, protože aerosol obsahuje menší částice, které snadněji pronikají stomaty. Při vyšších koncentracích měly nanočástice tendenci aglomerovat, a tudíž vytvářet větší částice, které hůř pronikaly do listů a ztížen byl také jejich transport do jiných částí rostliny. V místech aplikace  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  byla pozorována nekróza způsobená ucpáním průduchů, naopak po vystavení menším nanočásticím  $\text{MgO}$  se nekróza neobjevila. Při analýze se nanočástice nacházely v listech, v cévním systému, v kořenech, ale naopak nebyly nalezeny v mezofylu a chloroplastech. Menší částice tedy snadněji proniknou průduchy do listů, projdou stonkem a díky rozvodu floémem dosáhnou kořenů.

Přijem nanočástic listy je tedy silně závislý na druhu rostliny, velikosti nanočástic, jejich koncentraci a množství, způsobu aplikace, prostředí a struktuře listu. (Wang et al., 2013)

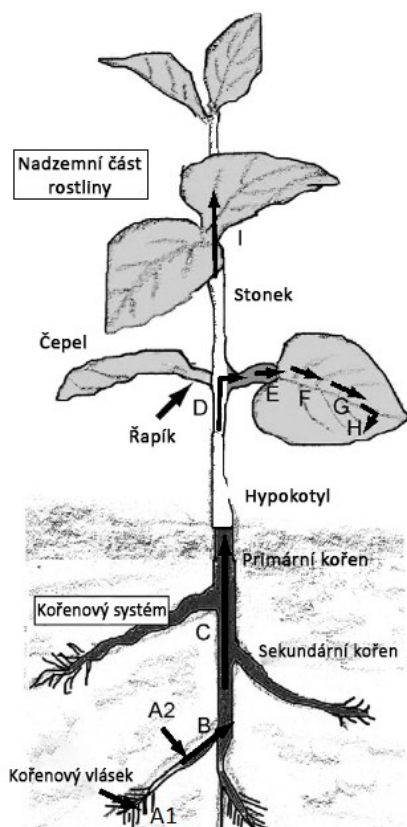
Na povrchu kořene se nalézají jedna vrstva buněk – kořenová pokožka (v cizojazyčné literatuře epidermis, v české rhizodermis). Pod ní je mnohovrstevná primární kůra (cortex), dále se dělí na exodermis, mezodermis a endodermis. Endodermis odděluje primární kůru

---

<sup>1</sup> Asimilační pletivo (slouží k fotosyntetické přeměně oxidu uhličitého); tvořen chlorenchymem a mezibuněčnými prostory

od středního válce a obsahuje Casparyho proužky, které zabraňují apoplastickému transportu externích materiálů do středního válce, to znamená, že transport přes Casparyho proužky může probíhat pouze symplasticky. Střední válec nebo také centrální válec, centrální cylindr nebo stéle obsahuje vodivá pletiva floém a xylém. Xylém je pletivo, které rozvádí živiny z kořenů do nadzemních částí rostliny a je nejdůležitějším nástrojem v distribuci a translokaci látek z kořenů. (Vinter, 2009)

Při příjmu nanočástic kořenem musí nanočástice projít buněčnou stěnou a membránou kořenové pokožky. Mohou tak učinit pomocí pórů na buněčné membráně, které mají velikost 5–20 nm, takže příjem nanomateriálu závisí na jeho velikosti. (Tripathi et al., 2017) To potvrdilo i několik výzkumů, např. nanočástice  $\text{TiO}_2$  o velikosti 25 nm, které byly aplikovány na povrch kořenů sazenic kukuřice seté (*Zea mays*) se shlukovaly a bránily příjmu vody a hydraulické konduktivitě. V důsledku došlo ke zpomalení růstu listů a rychlému zablokování apoplastického toku. (Asli a Neumann, 2009) Naopak velmi malé nanočástice  $\text{TiO}_2$  (3 nm) s modifikovaným povrchem byly schopny vstoupit do buňky huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a tam se akumulovat. (Kurepa et al., 2010)

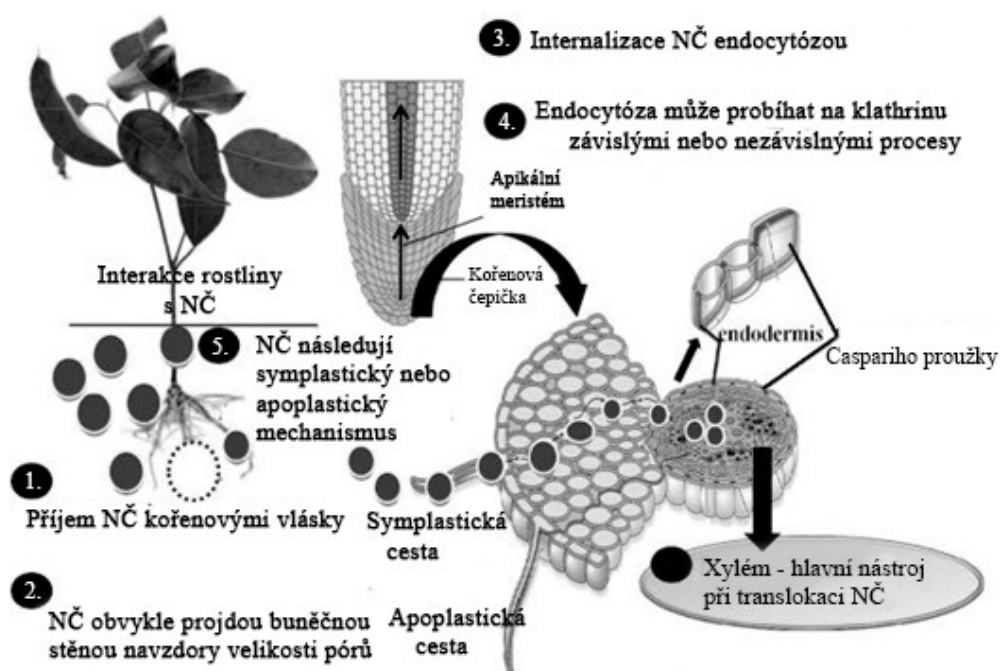


Obrázek 1: Přehled a obecný princip příjmu, transportu a akumulace nanočástic v cévnaté rostlině. NČ jsou absorbovány primárními kořeny (A2) nebo laterálními kořeny (A1, poté B). Potom jsou přemístěny z kořene (C), přes stoněk (D a I) do listu (E, F, G, H). Nanočástice mohou být také adsorbovány na povrchu kořene. (Ma et al., 2010)



Mechanismus příjmu nanočástic do buňky je obecně považován za aktivní transportní mechanismus, který zahrnuje několik dalších buněčných procesů jako je buněčná signalizace (komunikace mezi buňkami), recyklace a regulace plazmatické membrány. (Etcheberria et al., 2009) Buněčná stěna se chová jako polopropustná membrána, která umožňuje projít přes póry pouze vybraným částicím. Nanočástice mohou do rostlinné buňky vstoupit také pomocí membránových transportních proteinů nebo akvaporinů (proteiny, které regulují tok vody přes membránu), iontových kanálů, endocytózy nebo se vážou na organické látky v prostředí. Jelikož mají nanočástice vysokou hodnotu specifického povrchu vzhledem k „bulk“ materiálům, více reagují se svým prostředím. Nanočástice mohou vytvářet komplexy s membránovými transportéry nebo kořenovými exudáty (výměšky) a následně být znova přepraveny do rostliny. (Rico et al., 2011) Endocytóza zahrnuje dva způsoby transportu látek do buňky: na klathrinu závislé nebo nezávislé procesy. Klathrin je protein, který umožňuje vznik váčků při endocytóze. Při prvním zmíněném procesu se nejprve vytvoří shluky molekul a látek na plazmatické membráně, které se poté přemění na klathrinem opláštěné váčky. Na klathrinu nezávislé procesy mohou probíhat třemi způsoby – a) fagocytóza, b), c) raft-dependentní endocytóza – kaveolární a nekaveolární. (Tripathi et al., 2017; Murphy et al., 2005)

Když se nanočástice dostanou do buňky, mohou být přemísťovány symplasticky nebo apoplasticky a mezi buňkami se mohou pohybovat pomocí plazmodezmat (velikost 20–50 nm). (Rico et al., 2011) Aby mohly být nanočástice rozvedeny do zbytku rostliny, musí dosáhnout středního válce, ve kterém je umístěn xylém. (Tripathi et al., 2017)



Obrázek 2: Návrh modelu příjmu a pohybu nanočástic (Tripathi et al., 2017)

Zhu et al. (2008) se zabývali příjmem nanočástic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (20 nm) kořeny u rostlin fazolu měsíčního (*Phaseolus limensis* L.) a tykve obrovské (*Cucurbita maxima*), které byly pěstovány hydroponicky. Zatímco ve fazolu nebyly nanočástice detekovány, v rostlině tykve byla přítomnost nanočástic zjištěna jak v kořeni, tak ve stonku i listech. Velké množství nanočástic zůstalo naakumulováno na povrchu kořene. Pokud byly ale rostliny pěstovány v půdě, pak příjem nanočástic pozorován nebyl a při pěstování v písku byl snížen. Na druhou stranu nanočástice stejného druhu o velikosti 25 nm kořeny tykve (*Cucurbita mixta*) přijaty nebyly. (Wang et al., 2010)

Co se týče nanočástic  $\text{CeO}_2$ , bylo zjištěno, že jejich příjem je silně závislý na druhu rostliny. Po vystavení sazenic sóji, vojtěšky (*Medicago sativa*), kukuřice a rajčete (*Lycopersicon esculentum*) různým koncentracím nanočástic, bylo ve vzorcích kořene měřeno jejich množství. Nicméně se nedalo rozlišit, zda přítomné částice byly do kořene absorbovány nebo navázány na kořenové vlášení a exudáty. Koncentrace  $\text{CeO}_2$  se mezi druhy signifikantně lišila, nejvíce nanočástic bylo nalezeno ve vojtěšce, poté v rajčeti, sóji a nakonec kukuřici. Tato různá míra akumulace může být vysvětlena specifickými rozdíly ve stavbě kořenů a fyzikálními a chemickými reakcemi mezi nanočásticemi a kořenovými výměškami. (Rico et al., 2011) Také byl zkoumán příjem nanočástic  $\text{CeO}_2$  ředkvičkou, které rostlina absorbovala ve dvou formách. Příjem probíhal jako příjem nanočástic  $\text{CeO}_2$  nebo jako cernatých iontů, kdy část nanočástic byla na povrchu kořenů přeměněna na ionty a až poté kořeny přijata (Zhang et al., 2017).

Závislostí příjmu nanočástic  $\text{TiO}_2$  na jejich velikosti (14 nm a 25 nm) a druhu rostliny (řepka a pšenice) se zabývali Larue et al. (2012). Částice byly nalezeny jak na povrchu endodermis, tak i uvnitř kořene s tím, že nanočástice o velikosti 14 nm byly v penetraci do dřeně kořene úspěšnější. Obecně řepka obsahovala větší množství nanočástic uvnitř kořene, ale nanočástice o velikosti 25 nm nedosáhly až do středního válce, zatímco u pšenice byly obě velikosti nanočástic nalezeny i ve středním válci.

Lin a Xing (2008) potvrdili příjem  $\text{ZnO}$  nanočástic jíllem (*Lolium perenne*). Docházelo k adsorpci nanočástic a jejich agregátů na povrchu kořene. Částice byly také absorbovány do pokožky kořene a cévního svazku. Přesněji byly pozorovány v mezibuněčných prostorech, cytoplazmě a dokonce v buněčných jádrech. Další výzkum obsahující  $\text{ZnO}$  nanočástice provedli López-Moreno et al. (2010). Použili nanočástice o velikosti 8 nm a sóju (*Glycine max*), její sazenice vystavili nanočásticím o různých koncentracích. Rostlina měla tendenci přijmout více Zn, pokud byla vystavena suspenzi o

nižší koncentraci. Při vyšších koncentracích se předpokládá zvýšená pravděpodobnost tvorby agregátů, což ztěžuje průchod částic přes buněčné stěny a tím snižuje příjem. Je možné, že ZnO byl ionizován kořenovými výměškami na povrchu kořene, protože při analýze zjistili, že se  $Zn^{II}$  v rostlině nevyskytuje ve formě ZnO.

I přes množství provedených studií s různými druhy rostlin a nanočástic, stále nejsou objasněny přesné mechanismy toho, proč právě některé rostliny snadno přijímají určité nanočástice. (Rico et al., 2011)

### **3.3. Cévnaté rostliny – transport, přeměna a akumulace**

Jak již bylo řečeno, po vstupu do rostliny se nanočástice pohybují pletivou intracelulárně a/nebo extracelulárně až dosáhnou středního válce s vodivým pletivem – xylémem. Pokud jsou částice přijímány kořeny, musí se zvláštní pozornost věnovat Casparyho proužkům. Přesný mechanismus, kterým nanočástice překonávají tuto překážku musí být ještě prozkoumán, ale předpokládá se, že vstup nanočástic je umožněn přes sekundární kořeny nebo špičku kořene, kde nejsou Casparyho proužky plně vyvinuté. Sekundární kořeny se anatomicky vyvíjejí z vrstvy buněk umístěné těsně pod endodermis (tyto buňky se nazývají pericykl) a jsou tedy přímou cestou do vodivých pletiv bez nutnosti symplastického transportu. Když nanočástice dosáhnou cévního systému, mohou být rozvedeny do nadzemních částí rostliny společně s vodním transpiračním proudem nebo živinami. Stejně jako jejich příjem, i translokace nanočástic je závislá na složení, velikosti, tvaru a modifikaci nanočástice a druhu rostliny. (Siddiqui et al., 2015; Majumdar et al., 2014) Pokud se nanočástice v rostlině už dále nepohybují, vyvstává zde důležitá otázka, a to kde a v jaké formě jsou uvnitř rostliny nanočástice uchovávány. (Rico et al., 2011) Z dostupné literatury vyplývá, že se nalézají v rostlinných buňkách a pletivech, a to buď v původním stavu, nebo vázané v jiných formách, což ukazují i různé výzkumy níže.

Zhu et al. (2008), kteří potvrdili příjem 20 nm  $Fe_3O_4$  tykví obrovskou dále zjistili, že nanočástice byly rozvedeny z kořenů do stonku a listů, kde se akumulovaly. V listech bylo zjištěno velké množství nanočástic bez závislosti na vzdálenosti listu od kořenů, i když zde jsou vodivé cévy mnohem užší než ty ve stonku. Ve stonku se nacházelo mnohem méně nanočástic než v jiných částech rostliny. Největší koncentrace nanočástic byla pozorována těsně nad kořeny, což může být způsobeno jejich aglomerací.

Mnoho výzkumů se věnovalo průzkumu interakcí různých druhů rostliny s nanočásticemi  $TiO_2$ , protože právě tyto nanočástice patří mezi nejvyužívanější a našly

uplatnění v mnoha odvětvích. Například nanočástice  $\text{TiO}_2$  o velikostech 14 a 25 nm byly úspěšně rozvedeny z kořene pšenice a řepky do jejich listů. Byla zde pozorována závislost transportu nanočástic na jejich velikosti – menší částice byly pohyblivější. (Larue et al., 2012) U studie zahrnující nanočástice  $\text{TiO}_2$  o různých velikostech (anatás 14, 25, 140 nm a rutil 22, 36, 655 nm) byla také ukázána závislost transportu nanočástic na jejich velikosti. Nanočástice o velikosti pod 36 nm dosáhly středního válce v kořenech pšenice (*Triticum aestivum*) a distribuovaly se po rostlině beze změn. Zatímco nanočástice o velikostech mezi 36 až 140 nm se dostaly do primární kůry, ale již ne do stéle, tudíž se nemohly přemístit dále do listů. Nanočástice větší než 140 nm se v kořenech vůbec neakumulovaly. (Larue et al., 2012)

Peng et al. (2015) zkoumali příjem, transport a přeměnu nanočástic  $\text{CuO}$  v rýži (*Oryza sativa* L.). Nejvíce nanočástic bylo přítomno v kořeni, listech, stonku a mladých lístcích, sestupně. Díky RTG absorpční spektrometrii zjistili, že měď se v rostlině nacházela v několika formách, a to jako nanočástice  $\text{CuO}$ ,  $\text{Cu-cystein}$ ,  $\text{Cu-citrát}$  (deriváty kyselin),  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  a  $\text{Cu}_2\text{O}$ , kdy byla prodělána redukce z  $\text{Cu}^{\text{II}+}$  na  $\text{Cu}^{\text{I}+}$ . Vznik jiných sloučenin  $\text{Cu}$  je možný díky nízkému pH v buňce, což umožňuje rozpuštění  $\text{CuO}$  nanočástic. Rozpuštěné ionty se poté sloučily s citrátovými nebo fosfátovými ligandy nebo se navázaly na aminokyseliny předtím, než byly rozvedeny po rostlině. Největší množství  $\text{Cu}$  ve formě nanočástic  $\text{CuO}$  bylo nalezeno v kořenech (68,8 %) a dramaticky pokleslo v mladých listech (24,2 %).  $\text{Cu-cystein}$  se v kořenech nenacházel, ale bylo zde pozorováno malé množství  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ . Přehled rozložení koncentrace všech forem akumulované mědi je uveden v tabulce 1.

Tab.1: Přehled akumulace různých forem  $\text{Cu}$  v rýži (v %)

|             | Nano- $\text{CuO}$ | $\text{Cu-cystein}$ | $\text{Cu-citrát}$ | $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ | $\text{Cu}_2\text{O}$ |
|-------------|--------------------|---------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------|
| Kořeny      | 68,8               | 0                   | 15,7               | 6,3                          | 9,7                   |
| Listy       | 53,5               | 11,8                | 23,2               | 0                            | 11,4                  |
| Stonek      | 36,4               | 19,2                | 28,4               | 0,5                          | 15,5                  |
| Mladé listy | 24,2               | 27,7                | 21,7               | 0,8                          | 18,4                  |

Měď se v kořeni akumulovala v epidermis, exodermis i centrálním válci s tím, že mnohem více  $\text{Cu}$  bylo přítomno v laterálních kořenech než v těch hlavních. V každé lokaci se měnil podíl forem, ve kterých byla měď vázána. V buňkách a na buněčných stěnách se  $\text{Cu}$  vyskytovala výhradně ve formě  $\text{Cu-citrátu}$ , zatímco v mezibuněčných prostorech byla

přítomna jako nanočástice CuO. V listech se měď akumulovala převážně v cévách, zejména na okrajích listů. Tato distribuce může být přičítána pohybu nanočástic s vodním transpiračním proudem směrem ke koncům cévního systému.

Nanočástice CuO (20–40 nm) byly také přijaty a dále rozváděny kukuřicí. Z kořenů do listů byly transportovány xylémem, ve kterém byly při analýze přítomny. Předpokládá se, že přes Casparyho proužky se nanočástice dostaly ve vrcholu kořene, kde nejsou plně vyvinuty. Také bylo zaznamenáno, že nanočástice CuO se mohou přesunout floémem z listů znova do kořenu. Mechanismus tohoto transportu zůstává neznámý. Během tohoto přesunu mohou být nanočástice redukovány z  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ . (Wang et al., 2012) Transport nanočástic floémem z listů do stonku, kořenů a květů byl pozorován i při foliární expozici  $\text{CeO}_2$  nanočástic na okurku. Nanočástice byly aplikovány na listy jako suspenze nebo jako prášek. V listech byla koncentrace nanočástic o mnoho vyšší při vystavení suspenzi, ale koncentrace nanočástic v dalších částech rostliny byla srovnatelná při vystavení jak suspenzi, tak prášku. To může znamenat, že translokace nanočástic v pletivech listů je limitována. Na rozdíl od předchozí studie zůstaly nanočástice při transportu stále ve formě  $\text{CeO}_2$ , ve které se také akumulovaly uvnitř i vně buněk. (Hong et al., 2014) Další studie zabývající se  $\text{CeO}_2$  nanočásticemi zkoumala příjem nanočástic kořeny fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*). Cer byl nalezen v kořenovém vlášení, epidermálních buňkách, v buňkách primární kůry a v oblasti cévních svazků. Cer ale nebyl detekován v endodermis, což naznačuje, že se cer v rámci kořenů pohybuje apoplasticky. Velká koncentrace Ce byla také nalezena ve vodivých pletivech, které spojují sekundární kořeny s vodivým systémem. To může znamenat, že se cer šíří přes oblast postrádající Casparyho proužky v místech, odkud vyrůstají sekundární kořeny. V epidermis se cer nacházel jak ve formě nanočástic  $\text{CeO}_2$ , tak redukován na  $\text{Ce}^{\text{III}}$ -acetát. Redukce byla pravděpodobně způsobena nízkým pH (5,8) a kyselou povahou kořenových exudátů. Nanočástice byly úspěšně detekovány i ve stoncích a listech. S postupem času při expozici rostliny nanočásticím rostlo množství nanočástic v nadzemních částech rostliny a klesalo jejich množství v kořenech. Koncentrace nanočástic v nejstarších listech byla při prvním odběru vzorku o mnoho vyšší než při dalším odběru, zároveň koncentrace nanočástic rostla v novějších listech, což naznačuje transport nanočástic floémem. (Majumdar et al., 2014)

Hernandez-Viezcas et al. (2013) studovali příjem a transport nanočástic  $\text{CeO}_2$  a ZnO rostlinou sóji, kterou pěstovali v květináčích v zemědělské půdě impregnované nanočásticemi. Nanočástice  $\text{CeO}_2$  byly nalezeny v kořeni převážně v epidermis a také v menší míře v luscích a to převážně ve své původní formě, i když malá část Ce podlehl

reduckí z  $\text{Ce}^{\text{IV}}$  na  $\text{Ce}^{\text{III}}$ . Zinek byl také úspěšně rostlinou rozveden až do lusků, ale v zrnech nalezen nebyl. Největší koncentrace zinku se nacházela v kořeni v epidermis a ve stonku ve floému. Nicméně na rozdíl od nanočástic  $\text{CeO}_2$ , zinek se v rostlině nevyskytoval ve formě nanočástic  $\text{ZnO}$ , ale nejspíše jako  $\text{Zn}$ -citrát ( $\text{Zn}$ -O vazba) ve stonku a  $\text{Zn}$ -citrát a  $\text{Zn}$ -nitrát v kořeni. Jiní vědci, kteří zkoumali příjem a transport nanočástic  $\text{ZnO}$  jíllem nezaznamenali významný pohyb zinku v rostlině, i když byl přítomen v cévním svazku. Translokační faktor (koncentrace  $\text{Zn}$  v nadzemních částech rostliny/kořenech) byl velmi nízký, což znamená, že pouze malé množství  $\text{ZnO}$  (pokud vůbec) je schopno vzestupného pohybu v rostlině. (Lin a Xing, 2008)

Z těchto výzkumů lze vyčíst určité trendy: (1) malé agregáty nebo individuální částice jsou očividně více schopny pohybovat se na dlouhé vzdálenosti než velké agregáty nanočástic stejného druhu; (2) obecně platí, že koncentrace nanočástic v listech je vyšší než koncentrace ve stonku (množství nanočástic/sušina); (3) přeměna nanočástic je závislá na složení nanočástice a druhu rostliny; a také bylo zjištěno, že (4) nanočástice v listech mají tendenci se akumulovat ve vodivých pletivech nebo v jejich blízkosti. (Deng et al., 2014)

#### **4. Biomonitoring**

Biomonitoring lze definovat jako použití biologického materiálu (organismu nebo jeho části) k získání (kvantitativní) informace o určitých vlastnostech biosféry. Informace např. o znečištění poté vyplývají ze změn chování monitorovaných organismů nebo z koncentrace specifických látek ve tkáních monitorovaného organismu. Velmi důležitý je výběr organismu – hlavní výhoda biomonitoringu je spjata převážně se stálým a běžným výskytem organismu v zájmové oblasti, jednoduchým vzorkováním a absencí potřeby drahého a složitého technického vybavení. (Wolterbeek, 2002)

Biomonitoring můžeme dělit na aktivní a pasivní. Aktivní biomonitoring znamená, že bioindikátory nebo biomonitory kultivované v laboratořích jsou exponovány ve standardizované podobě v zájmové oblasti po určitý časový úsek. Na konci expoziční doby se zaznamenají vyvolané reakce nebo se analyzují naakumulované cizorodé látky. V případě pasivního biomonitoringu se bioindikátory (biomonitory) již vyskytují v životním prostředí a jsou zkoumány jejich odezvy. (Markert, 2007)

Bioindikátor je organismus (nebo jeho část či celá populace), který obsahuje informaci o kvalitě životního prostředí. Biomonitor je naopak organismus (nebo jeho část či

celá populace), který dokáže podat kvantitativní informace o kvalitě životního prostředí. (Markert, 2007)

#### 4.1. Bryomonitoring

Bryomonitoring využívá analýzu mechorostů, která určuje množství prvků v nich naakumulovaných pomocí atmosférické depozice. Jelikož hlavním příjmem prvků u mechorostů je právě atmosférická depozice, vzniká tak velmi úzká korelace mezi obsahem určitého prvku v mechu a množstvím tohoto prvku v monitorované oblasti. Bryoindikace byla představena již v pozdních 60. letech 20. století (Rühling a Tyler, 1968 a Rühling a Tyler, 1972; Goodman a Roberts, 1971). Postupem času byla tato technika standardizována a nyní je bryomonitoring celoevropskou záležitostí. (Sucharová a Suchara, 1998)

Jednou z metod bryomonitoringu je tzv. „moss bags“ metoda, která využívá suchý nebo čerstvý mech, který byl nasbírán v neznečištěných oblastech. Ten je v nylonových sítkách umístěn do znečištěné oblasti na určitý časový úsek (týdny až měsíce). Po expozici se měří koncentrace těžkých kovů v těchto vzorcích. Tato technika je nejčastěji využívána v městských oblastech a průmyslových aglomeracích, kde se vhodné mechy přirozeně nevyskytují. Nejčastěji používanými druhy jsou rašeliníky (*Sphagnum* spp.), méně často také *Hypnum cupressiforme* (Hedw.), *Hylocomium splendens* (Hedw.) nebo *P. schreberi*. (Markert et al., 2003)

V rámci Mezinárodního bryomonitorovacího programu, kterého se pravidelně účastní mnoho evropských zemí (např. Německo, Rakousko, Slovensko, Polsko) probíhá na území České republiky každých 5 let rozsáhlý biomonitoring. První výzkum byl proveden v roce 1991 a (zatím) poslední v roce 2016. (Frontasyeva et al., 2016) V letech 1995–1996 byly odebírány vzorky mechorostů druhů *P. schreberi*, *H. cupressiforme*, a *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) Fleisch z oblastí přibližně 20x20 km ve 195 lokalitách. Odebíraly se apikální segmenty o stáří přibližně 2 roky, tudíž výsledky analýz znečištění se vztahují k období 1994–1995. V meších se sledovala míra akumulace především těžkých kovů, jmenovitě Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Ni, Pb, S, V a Zn. Bylo nalezeno pět oblastí s největším znečištěním: tzv. černý trojúhelník v severozápadních Čechách, černý trojúhelník na severovýchodní Moravě, česká část Jizerských a Krkonošských hor, průmyslová část jihozápadních Čech a průmyslová část jižní Moravy. Průměrný obsah těžkých kovů v mechorostech v Česku byl srovnatelný s hodnotami z Německa a Polska, nižší v porovnání se Slovenskem a vyšší v porovnání s Rakouskem. Naměřené koncentrace byly 2–3krát vyšší než v nejčistších částech Evropy (severské země). Na druhou stranu byly

v roce 1995 naměřeny výrazně nižší koncentrace těžkých kovů než v roce 1991. To bylo způsobeno především omezením produkce metalurgických a chemických závodů, odsiřovacími programy a efektivním zadržováním polétavého prachu v elektrárnách. Porosty *H. cupressiforme* jsou velmi husté, proto tento druh lépe absorbuje prvky skrze atmosférickou depozici než *P. schreberi* nebo *P. purum*, které rostou v řidších koberecích. Je možné, že právě proto byly v *H. cupressiforme* naměřeny o 50–125 % vyšší koncentrace Al, Co, Mo, Ni, Pb a Zn než v dalších zmíněných druzích. Nicméně vzorky *H. cupressiforme* byly odebrány pouze na 11 % odběrných míst, které byly situovány hlavně ve velmi znečištěných oblastech, což může být také důvod, proč naměřené koncentrace byly vyšší. (Sucharová a Suchara, 1998) V letech 2000 a 2005 byl v biomonitorech zaznamenán pokles koncentrace mnoha těžkých kovů, které jsou produkovány těžkým průmyslem (Al, As, Cd, Co, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn a další). Tato změna byla způsobena především pokračujícím útlumem průmyslové výroby – těžkého průmyslu a strojírenství, poklesu množství průmyslově spalovaného uhlí a zastavení distribuce olovnatých benzínů. Vliv na množství těžkých kovů v atmosféře má také změna výrobních programů, zavádění nových technologií snižujících emise sledovaných prvků a přísnější legislativa v ochraně ovzduší. (Sucharová et al., 2008)

## 5. Metoda sekvenční extrakce

Mnoho studií se při bryomonitoringu zaměřuje na zjištění celkových koncentrací sledovaných prvků v mechu. Ale metoda sekvenční extrakce (sequential elution technique, SET) umožňuje určit, jak jsou prvky naakumulovány v různých částech rostliny (na buněčné úrovni) a jak různé podmínky mohou ovlivnit distribuci látek v rostlině. Definice této lokace je velmi přesná a usnadňuje toxikologickou interpretaci výsledků. Tato technika také poskytuje více informací o biologické dostupnosti kontaminantů (a s tím spojenými riziky) nebo o jejich toxicitě. (Pérez-Llamazares et al., 2011)

Minerály nebo kovy mohou být lokalizovány v těchto částech rostliny: (1) intercelulárně: prvky rozpuštěné v roztoku, který obklopuje buněčné stěny a buněčné membrány, nejsou vázány k buňkám; (2) extracelulárně: prvky navázané na buněčnou stěnu a vnější vrstvu plazmatické membrány; (3) intracelulárně: prvky přítomné v cytoplasmě nebo organelách, navázané na vnitřní vrstvě plazmatické membrány; a (4) zbytkové: složený z extracelulárních částic a/nebo nerozpustných částic uvnitř buňky. (Pérez-Llamazares et al., 2011)



Je důležité, aby použitými extrakčními činidly nebyla narušena permeabilita plazmatické membrány, jinak mohou být některé prvky obsažené v intracelulární frakci počítány jako extracelulární. Celistvost plazmatické membrány souvisí s poměrem a distribucí některých nutrientů (K, Ca, Mg) v extracelulární a intracelulární frakci. Obecně platí, že draslík je přítomen v intracelulárních částech rostliny, zatímco Ca je nejvíce vázán na extracelulární výměnná místa. Koncentrace hořčíku je přibližně stejná v obou lokacích. (Pérez-Llamazares et al., 2011)

Distribuce mezi extracelulární a intracelulární frakcí je ovlivněna druhem rostliny a okolními podmínkami. Jedním z těchto faktorů může být vysychání. Ovšem pokud organismus neutrpí závažnou újmu, změny v permeabilitě membrány mohou být vratné. Brown a Buck (1979) ukázali, že uchování mechů ve 100% vlhkosti umožňuje, aby membrány získaly zase normální permeabilitu.

Prvním krokem SET je omytí materiálu demineralizovanou (DEMI) nebo destilovanou vodou, do které se vyplaví rozpustné látky z intercelulárních prostor. Je možné, že tento krok také smyje některé částice (např. prach) z povrchu organismu. Druhým krokem je ponoření vzorku do roztoku, který obsahuje činidlo, které je schopno nahradit extracelulárně vázané prvky. Zde je velmi důležitý výběr správného činidla, jelikož musí být schopno efektivně extrahovat extracelulárně vázané prvky a nesmí změnit permeabilitu membrány. Třetí krok má za úkol vyplavit intracelulární obsah, proto by buněčné membrány v tomto kroku měly být narušeny. Toho se může dosáhnout mytím ve vroucí DEMI vodě, totálním rozkladem nebo mytím ve zředěné  $\text{HNO}_3$ . Někteří autoři také používali chelaton. Poslední frakce sestává ze zbytkového materiálu a může být kvantifikována společně s intracelulární frakcí nebo zvlášť. V případě samostatné frakce je tento krok nejčastěji proveden jako totální rozklad v kyselině. Je doporučeno, aby byl každý extrakční krok proveden alespoň na třech stejných vzorcích, aby se snížila analytická odchylka. (Pérez-Llamazares et al., 2011)

### **5.1. Výběr činidla**

Jak již bylo řečeno, výběr extrakčního činidla pro získání extracelulární frakce je velmi důležitý. Činidlo musí splňovat dvě podmínky: musí efektivně extrahovat extracelulárně vázané prvky a nesmí měnit permeabilitu buněčné membrány. Jedním ze způsobů extrakce může být použití roztoku kationtů, které nahradí kovy navázané na buněčné stěně a vnějším povrchu membrány. Nicméně obsah tohoto kationtu poté nemůže být kvantifikován. Další možností je například použití chelatačních činidel, což jsou

sloučeniny s vysokou afinitou ke kovovým kationtům, které jsou navázány na buněčné stěně a vnější straně plazmatické membrány. Mezi nejčastěji používaná extrakční činidla pro lišejníky nebo mechorosty patří  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  a chelaton 2 (EDTA). První tři činidla patří do skupiny kationtových extrakčních činidel, zatímco EDTA je chelatační činidlo. (Pérez-Llamazares et al., 2011)

Při prvním provedení SET Bates & Brown (1974) použili právě  $\text{SrCl}_2$ . V poslední době je nejčastěji používán  $\text{NiCl}_2$  o koncentraci  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Jednou z výhod  $\text{NiCl}_2$  je, že může být použit jako extrakční činidlo pro prvky jako K a Zn, protože dokáže v extracelulárních lokacích oba nahradit. (Brūmelis, 1999) Díky tomuto může také sloužit jako měřítko, zda jsou jiné potenciální extraktanty účinné. Extrakční činidla s jinými kationty byly použity pouze v jedné nebo ve dvou studiích. Zjistilo se, že nejsou příliš účinná, i když byla použita při vysokých koncentracích. Jiná činidla byla zase pro toto použití zamítnuta, jelikož roztoky byly i při nízkých koncentracích vysoce toxické a způsobovaly změny v permeabilitě plazmatické membrány. (Pérez-Llamazares et al., 2011)

Chelaton 2 byl použit ve studiích jak s mechorosty, tak s lišejníky. Kationty vázané na kationtových výměnných místech na buněčné stěně a plazmatické membráně se mohou navázat na OH funkční skupinu, čímž se uvolní do roztoku. Nicméně EDTA může způsobit malé trhliny v plazmatické membráně, které ale příliš neovlivňují konečný výsledek. Největší výhodou EDTA je, že umožňuje extrakci většího počtu prvků než jiná, běžně používaná extrakční činidla (např.  $\text{NiCl}_2$ ). Jiná chelatační činidla nejsou příliš používaná, jelikož neposkytují lepší výsledky než EDTA, mohou v extraktu vytvářet sraženiny nebo způsobovat analytickou interferenci. (Branquinho a Brown, 1994; Pérez-Llamazares et al., 2011)

## **6. Praktická část**

### **6.1. Sběr a příprava vzorků**

K výzkumu v této práci byl vybrán mechorost druhu *Pleurozium schreberi* Brid. Mitt. Byl vybrán především proto, že je často využíván v biomonitoringu a hojně se vyskytuje v oblasti sběru. Vzorky byly odebrány v září 2016 v lokalitě Staré Hamry (v blízkosti potoka Červík). Tato oblast se nachází v CHKO Beskydy a vyznačuje se nízkou hladinou znečištění, místo sběru leží v zalesněné oblasti v dostatečné vzdálenosti od komunikace a jiných bodových zdrojů znečištění.

Pro analýzu byly sbírány zelené apikální segmenty rostlin, v nichž je obsažena nejmenší koncentrace škodlivých látek přijatých z prostředí. Sběr byl prováděn ve vinylových rukavicích do igelitových pytlů, ve kterých byl převezen a uložen v laboratoři.

V laboratoři byl mechový materiál rozdělen na dvě poloviny. První část se šetrně omyla pod kohoutkovou vodou a rozložila na savý papír. Druhá část se pouze očistila od jehličí, trávy a jiných nečistot a také rozložila na savý papír. Po uschnutí byly vzorky přesunuty na označené Petriho misky a každá část byla opět rozdělena na dvě poloviny – první byla ponechána bez zásahu, druhá byla pravidelně vlhčena odstátou kohoutkovou vodou (2x týdně). Před samotnou expozicí došlo k dalšímu dělení, kdy z každé skupiny byla jedna polovina označena jako kontrolní vzorky a druhá byla exponována nanočásticím ZnO. Připraveno bylo 8 skupin po 8 vzorcích (Tab.2).

Tab.2: Skupiny připravených vzorků

| ošetření | zavlažování | expozice |
|----------|-------------|----------|
| mytý     | sušený      | + voda   |
|          |             | + ZnO    |
|          | vlhčený     | + voda   |
|          |             | + ZnO    |
| nemytý   | sušený      | + voda   |
|          |             | + ZnO    |
|          | vlhčený     | + voda   |
|          |             | + ZnO    |

## 6.2. Příprava suspenze ZnO a expozice

Pro expozici byla použita suspenze nanočástic ZnO o koncentraci  $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ , která byla připravována 30 minut v ultrazvukové lázni před každou expozicí. Samotná expozice probíhala 2x týdně (vždy v pondělí a ve čtvrtek) po dobu 5 týdnů. Používalo bylo 2,5 ml suspenze nanočástic ZnO (nebo DEMI vody pro kontrolní vzorky).

Po 5 týdnech byly vzorky ponechány k uschnutí při pokojové teplotě a poté polovina z každé skupiny byla umístěna do sušárny ( $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) na 24 hodin. Po tomto kroku byly vzorky rozděleny na 16 skupin, přičemž každá skupina obsahovala 4 vzorky přibližně stejné hmotnosti (0,4–0,8 g) (Tab. 3).

Tab. 3: Skupiny vzorků a jejich označení

| ošetření | zavlažování | expozice | metoda vysušení  | označení vzorku |
|----------|-------------|----------|------------------|-----------------|
| mytý     | sušený      | + voda   | sušárna          | US-C-E          |
|          |             |          | pokojová teplota | US-C            |
|          |             | + ZnO    | sušárna          | US-Zn-E         |
|          |             |          | pokojová teplota | US-Zn           |
|          | vlhčený     | + voda   | sušárna          | UM-C-E          |
|          |             |          | pokojová teplota | UM-C            |
|          |             | + ZnO    | sušárna          | UM-Zn-E         |
|          |             |          | pokojová teplota | UM-Zn           |
| nemytý   | sušený      | + voda   | sušárna          | NS-C-E          |
|          |             |          | pokojová teplota | NS-C            |
|          |             | + ZnO    | sušárna          | NS-Zn-E         |
|          |             |          | pokojová teplota | NS-Zn           |
|          | vlhčený     | + voda   | sušárna          | NM-C-E          |
|          |             |          | pokojová teplota | NM-C            |
|          |             | + ZnO    | sušárna          | NM-Zn-E         |
|          |             |          | pokojová teplota | NM-Zn           |

### 6.3. Extrakce a analýza

V této práci je jako extrakční činidlo pro extracelulární frakci použit  $\text{NiCl}_2$  o koncentraci  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$ , protože bylo zjištěno, že tato koncentrace je optimální. (Pérez-Llamazares et al., 2010) Dalším důvodem použití  $\text{NiCl}_2$  je jeho schopnost efektivně extrahovat Zn i K, což je při sledování množství nanočástic ZnO a makronutrientů v mechorostu velice žádoucí. Samotná sekvenční extrakce byla provedena podle metodiky Vázquez et al. (1999) a Pérez-Llamazares et al. (2010).

- I. Intercelulární a povrchová extrakce: v prvním kroku byly vzorky *P. schreberi* (přibližně 0,3 – 0,8 g) třepány 30 sekund v 50 ml DEMI vody. Vzorky byly zfiltrvány, filtrát stabilizován a uložen a mechový materiál byl vysušen při pokojové teplotě.

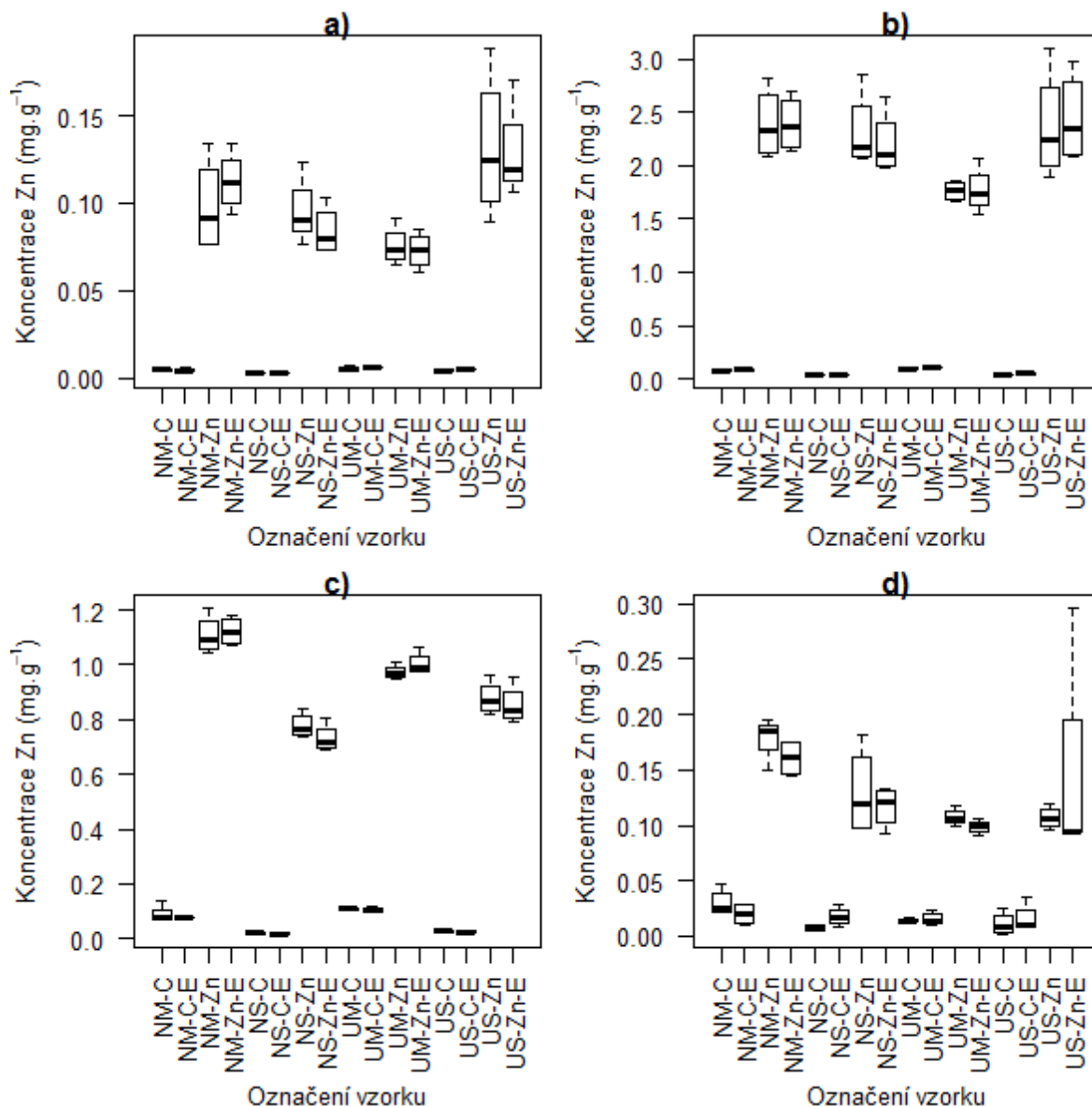
- II. Extracelulární extrakce: Vzorky byly třepány v extrakčním činidle – 20 mmol.l<sup>-1</sup> NiCl<sub>2</sub>. Toto bylo provedeno ve dvou krocích (doba třepání 45 + 30 minut), kdy mezi kroky bylo vyměněno extrakční činidlo. Vzorky byly zfiltrovány, filtrát stabilizován a uložen a mechový materiál byl vysušen při pokojové teplotě.
- III. Intracelulární extrakce: vysušený vzorek byl zvážen a 30 minut třepán v 1 mol.l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Do extrakčního činidla se vyplavily rozpustné intracelulární kovy.
- IV. Zbytková frakce: vzorek byl vysušen do konstantní hmotnosti a bylo naváženo přibližně 0,25 g do teflonového kelímku. Vzorek byl poté za horka rozložen ve směsi kyselin, zfiltrován a naředěn na jednotný objem.

V jednotlivých extraktech byla měřena koncentrace K, Mg, Na, Ca a Zn na spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES), případně byly vzorky ředěny a koncentrace K byla doměřována na atomovém emisním spektrometru (AAS). Před samotným měřením byly vzorky zfiltrovány přes jemný filtrační papír, aby se zamezilo ucpání přístrojů.

## 7. Výsledky

Výsledkem měření byl soubor dat pro koncentraci Zn, K, Ca, Mg a Na ve 4 frakcích – intercelulární a povrchová, extracelulární, intracelulární a frakce vzniklá celkovým rozkladem zbytkového materiálu. Pro potřeby této práce byly využity pouze data pro Zn a K. Z koncentrace Zn lze vyčíst jaký vliv měly jednotlivé úpravy mechového materiálu na míru akumulace ZnO nanočástic a jeho umístění v rostlině. Množství K v jednotlivých frakcích vypovídá o celistvosti buněčných membrán (K by v případě nenarušení membrán měl být situován především v buňce). Data byla zpracována s pomocí statistického softwaru R (R Core Team, 2016).

## 7.1. Zinek

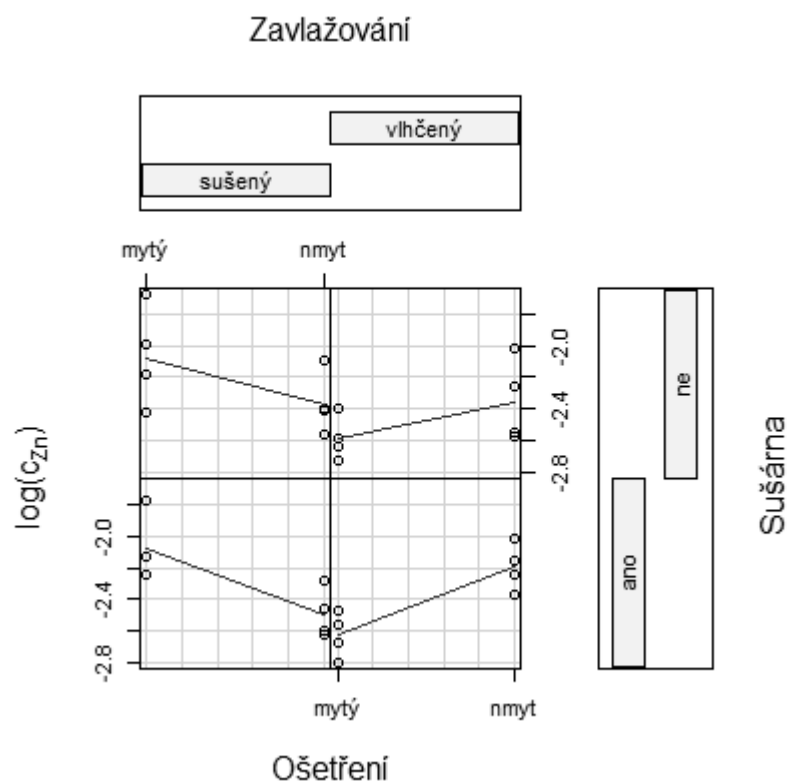


Obrázek 3: Koncentrace Zn ve vzorcích s různou úpravou a v různých částech stélky: a) na povrchu mechu a mezibuněčných prostorech, b) vázaného extracelulárně, c) v buňce, d) získaná celkovým rozkladem zbytkového materiálu

V Obrázku 3 je srovnání koncentrace Zn situovaného v různých částech stélky. Mezi kontrolními vzorky a vzorky, které byly vystaveny ZnO nanočásticím je zjevný rozdíl. Kontrolní vzorky obsahují pouze nepatrné množství zinku, z čehož lze vyvodit, že lokalita sběru byla vhodně zvolena a koncentrace zinku v exponovaných vzorcích reálně odpovídá nanočásticím ZnO. V intracelulární a povrchové frakci (Obr. 3 a)) bylo nalezeno nejvíce Zn v mytých sušených vzorcích, poté v nemytých vlhčených, nemytých sušených a nejméně zinku bylo nalezeno v mytých vlhčených vzorcích. Dále lze tvrdit, že u vzorků, které nebyly sušeny v sušárně zůstalo na povrchu a v mezibuněčných prostorech více Zn než u vzorků,

kteře byly po expozici do sušárny umístěny (ale toto pozorování neplatí u nemytých vlhčených vzorků). V extracelulární frakci (Obr. 3 b)), tzn. vázáno na buněčné stěně a vnější straně plazmatické membrány, byla koncentrace Zn nejvyšší (přibližně 20x více Zn než na povrchu a 2x více Zn než v buňkách). V této frakci bylo nejvíce Zn akumulováno ve vzorcích s úpravou nemytý vlhčený, mytý sušený, nemytý sušený a nejméně opět v mytých vlhčených. Uvnitř buněk (Obr. 3 c)) se v kontrolních vzorcích nacházelo již více zinku. Z grafu vyplývá důležitá závislost – u vzorků, které byly před expozicí vlhčené bylo v buňce přítomno více Zn než u vzorků, které byly před expozicí vyschlé. Zajímavá je skutečnost, že tento jev se vyskytuje jak u kontrolních, tak i exponovaných vzorků. Uvnitř buněk se nejvíce Zn nacházelo opět v nemytých vlhčených vzorcích, poté v mytých vlhčených a sušených byla koncentrace Zn přibližně stejná (pokud se vezme v úvahu koncentrace Zn v kontrolních vzorcích podléhající stejné úpravě) a v nemytých sušených byla koncentrace Zn nejnižší. V intracelulární frakci sušených vzorků (jak mytých, tak nemytých) umístěných po expozici do sušárny byl zaznamenán pokles Zn oproti vzorkům, které byly ponechány po celou dobu experimentu při pokojové teplotě. U vlhčených vzorků to bylo naopak, tedy vlhčené vzorky (myté i nemyté) umístěné do sušárny obsahovaly více Zn než stejné vzorky schnoucí při pokojové teplotě. Ve zbytkové frakci (Obr. 3 d)) bylo opět větší množství Zn u kontrolních vzorků, tento rozdíl je vizuálně umocněn malým rozsahem koncentrací, protože koncentrace Zn ve zbytkovém materiálu byla nízká (srovnatelná s intercelulární a povrchovou frakcí). Nicméně trend zůstává stejný jako v intracelulární frakci – vlhčené vzorky obsahovaly více Zn než vzorky, které byly před expozicí vysušené, i když tento rozdíl byl u umytých vzorků velmi malý. Ve zbytkové frakci byla v exponovaných nemytých vzorcích naměřena vyšší koncentrace Zn ve vlhčeném mechu než v sušeném, kdežto množství Zn v umytých vzorcích bylo srovnatelné. Na rozdíl od intracelulární frakce obsahují vzorky sušené v sušárně méně Zn bez ohledu na předešlou úpravu.

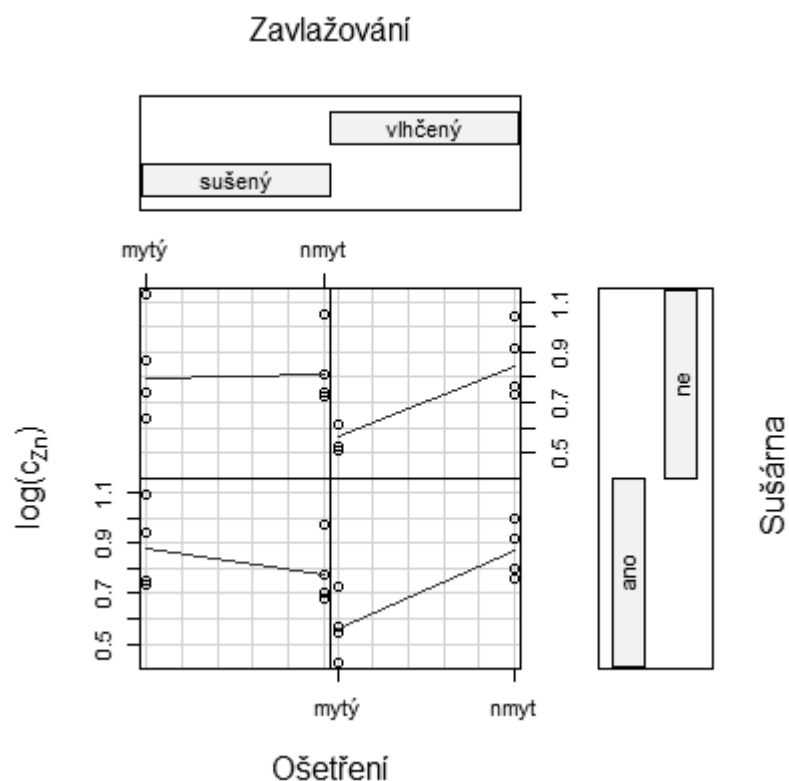
Dle analýzy variance měla na koncentraci nanočástic ve všech frakcích největší vliv nepřekvapivě expozice nanočásticím ( $p < 2 \cdot 10^{-16}$ ), proto následující grafy znázorňují data pouze pro exponované vzorky, aby více vynikly ostatní faktory ovlivňující míru akumulace nanočástic v různých částech stélky mechu.



Obrázek 4: Vliv jednotlivých faktorů na logaritmus koncentrace Zn v intercelulární a povrchové frakci exponovaných vzorků

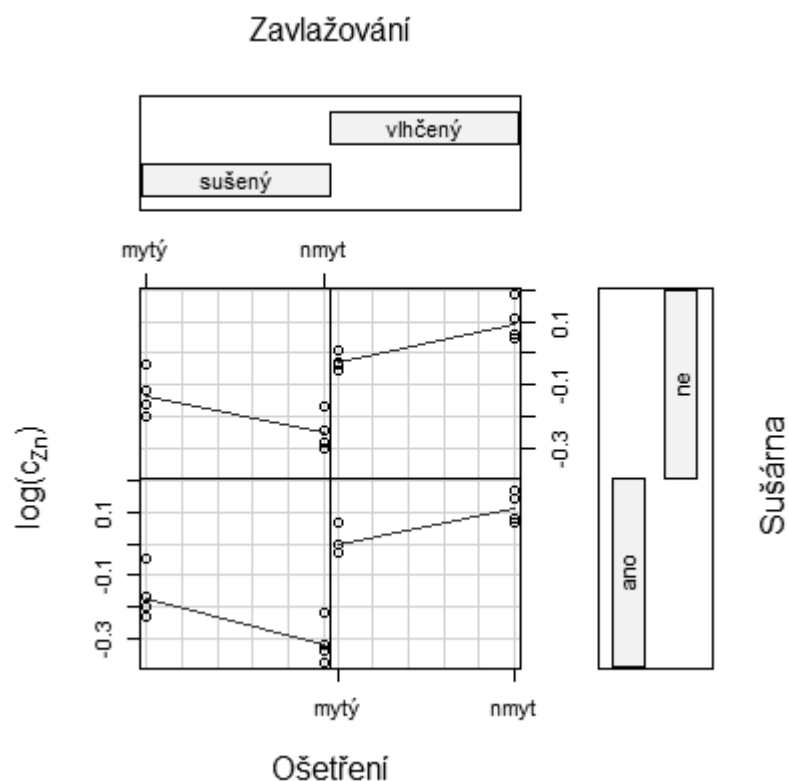
Největší vliv na množství nanočástic na povrchu mechu a v intracelulární části stélky měla kombinace faktorů ošetření a zavlažování ( $p = 8,4 \cdot 10^{-7}$ ) a samotné ošetření ( $p = 0,0006$ ). Z Obr. 4 plyne, že v mechu, který byl před začátkem expozice vysušen, bylo v mytých vzorcích více Zn než v nemytých, kdežto v pravidelně vlhčeném mechu byla závislost opačná – v mytých vzorcích byla koncentrace Zn nižší než v nemytých.





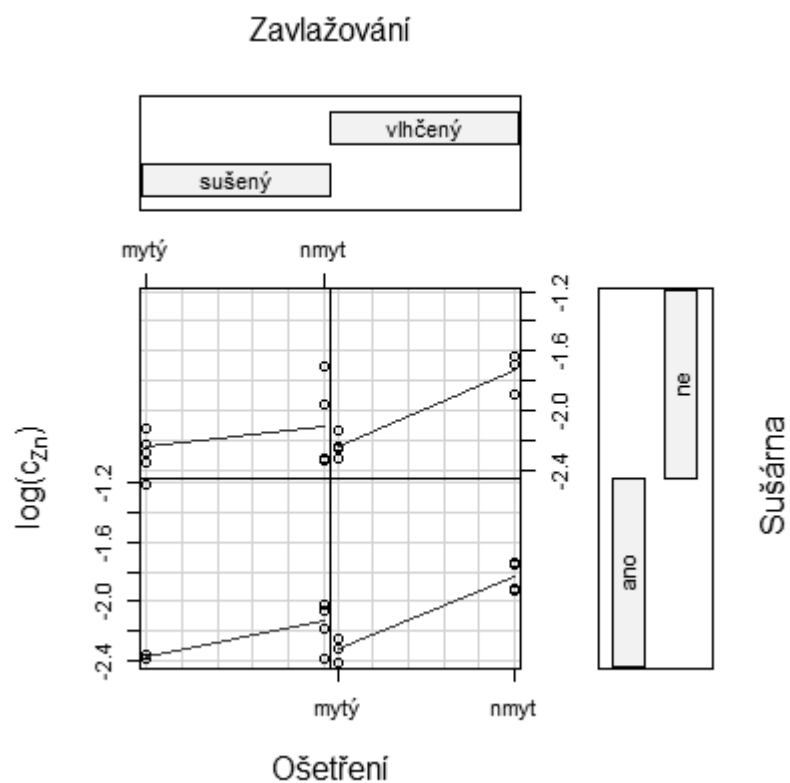
Obrázek 5: Vliv jednotlivých faktorů na logaritmus koncentrace Zn v extracelulární frakci exponovaných vzorků

Jediným významným faktorem ovlivňující množství nanočástic v extracelulární části stélky bylo zavlažování ( $p = 1,1 \cdot 10^{-12}$ ). Ve vysušených vzorcích téměř nemělo vliv, zda byl mech po přinesení do laboratoře omyt pod kohoutkovou vodou nebo byl pouze očištěn, koncentrace Zn je v obou případech srovnatelná. Pouze u nemytých vzorků umístěných po expozici do sušárny byl zaznamenán mírný pokles koncentrace Zn. Na druhou stranu ve vlhčených vzorcích mělo omytí mechového materiálu výrazný vliv – u nemytých vzorků se extracelulárně vázaného Zn nacházelo zřetelně více (Obr. 5).



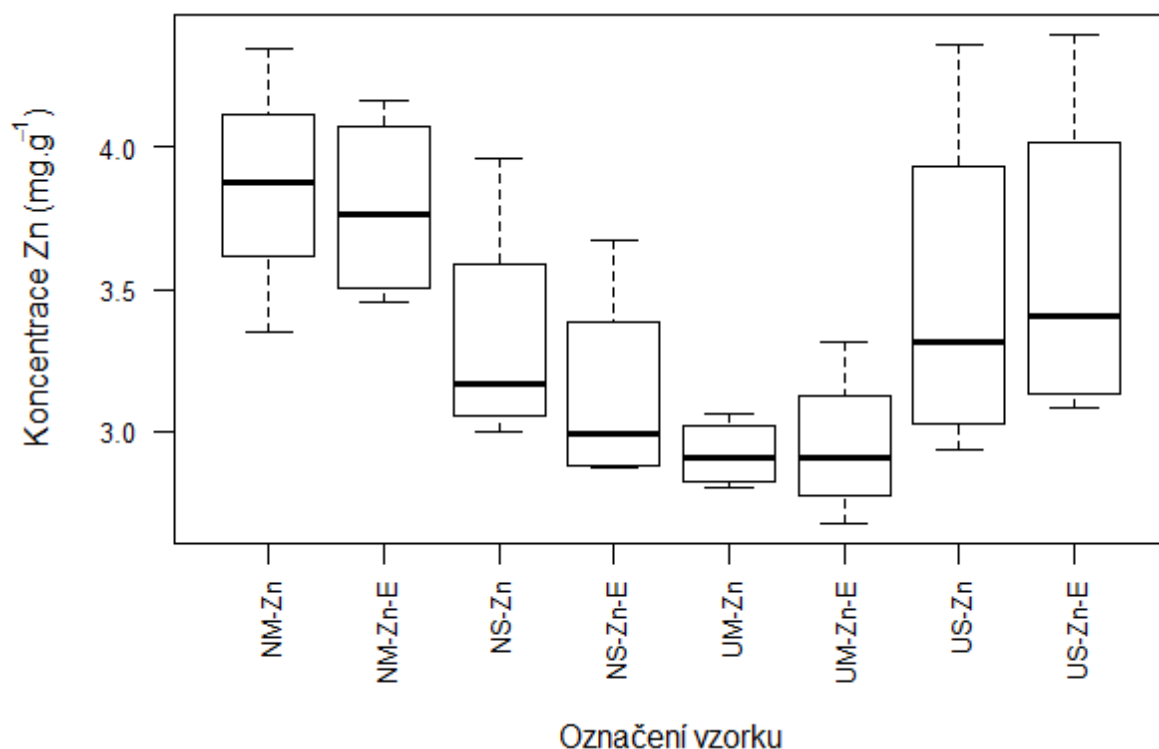
Obrázek 6: Vliv jednotlivých faktorů na logaritmus koncentrace Zn v intracelulární frakci exponovaných vzorků

Koncentraci nanočástic v buňce nejvíce ovlivňovalo (stejně jako u extracelulárně vázaného ZnO) zavlažování ( $p < 2.10^{-16}$ ), u pravidelně vlhčených vzorků byla koncentrace Zn vyšší než u sušených. Dále se významným vlivem vyznačovalo ošetření ( $p = 7.10^{-7}$ ) a kombinace obou zmíněných faktorů, tedy kombinace ošetření a zavlažování ( $p = 0,0042$ ). V intracelulární frakci (Obr. 6) se objevil podobný trend jako v povrchové frakci (Obr. 4), pouze závislost koncentrace nanočástic na mytí nebo nemytí mechu se liší (je opačná). Umytí mechu a následné vysušení umožnilo průniku většího množství nanočástic do buňky, než pouhé očištění (mech před sušením umyt nebyl). Vlhčené vzorky opět vykazovaly opačnou závislost – tedy u předem umytých vzorků se v buňce nacházelo méně nanočástic ZnO.



Obrázek 7: Vliv jednotlivých faktorů na logaritmus koncentrace Zn ve zbytkové frakci exponovaných vzorků

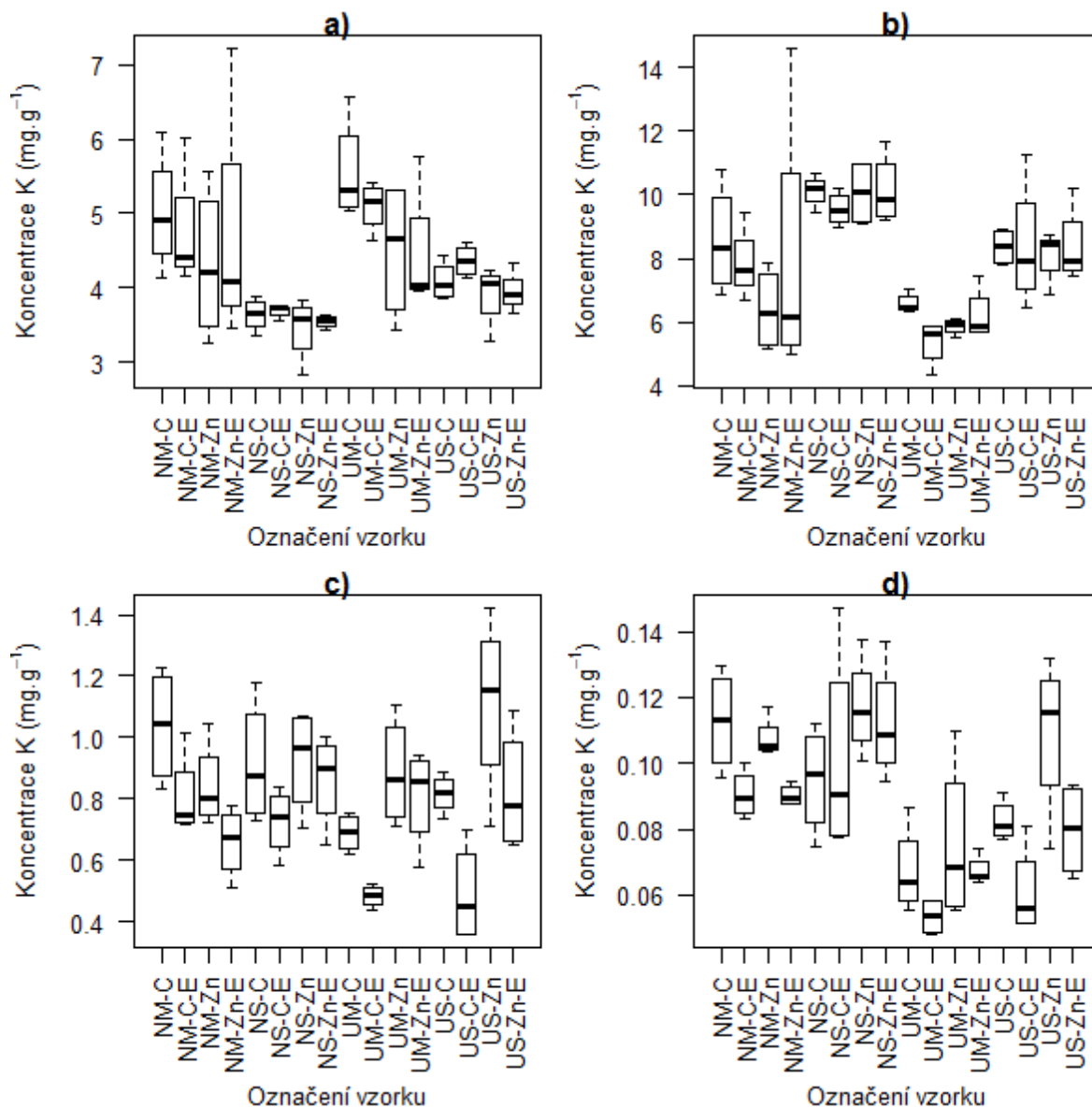
Stejně jako v předchozích frakcích, i ve zbytkové frakci mělo největší vliv na koncentraci nanočástic ZnO zavlažování ( $p = 0,005$ ), vliv mělo také ošetření ( $p = 0,03$ ). S jakoukoliv kombinací dalších faktorů se v nemytých vzorcích nacházelo více Zn než v mytých, i když u sušených vzorků nebyl tento rozdíl příliš markantní. Dále analýza variance ukázala vliv kombinace faktorů zavlažování a sušení v sušárně ( $p = 0,03$ ) a nevýznamný vliv kombinace ošetření a zavlažování ( $p = 0,07$ ).



Obrázek 8: Celkový obsah Zn v exponovaných vzorcích

Celkový obsah Zn (Obrázek 7) byl vypočten jako suma koncentrací Zn ve všech 4 frakcích. V tomto grafu nejsou zahrnuty kontrolní vzorky, aby vynikla závislost koncentrace Zn na jiných faktorech než jen na expozici nanočásticím. Nejvíce Zn obsahovaly vzorky s úpravou nemyté vlhčené. Obsah Zn postupně klesal v mytých sušených vzorcích (přibližně o 15 % méně Zn), nemytých sušených a nejnižší koncentrace Zn byla v mytých vlhčených vzorcích, která byla přibližně o 25 % nižší než ve vzorcích s nejvyšším obsahem Zn (NM). Umístění vzorků po expozici do sušárny mělo ve většině případů negativní dopad na koncentraci Zn, ta byla nižší u všech úprav mechů kromě kombinace mytí a sušení. Dle analýzy variance měla na celkovou koncentraci Zn vliv kombinace faktorů ošetření a zavlažování ( $p = 0,0007$ ).

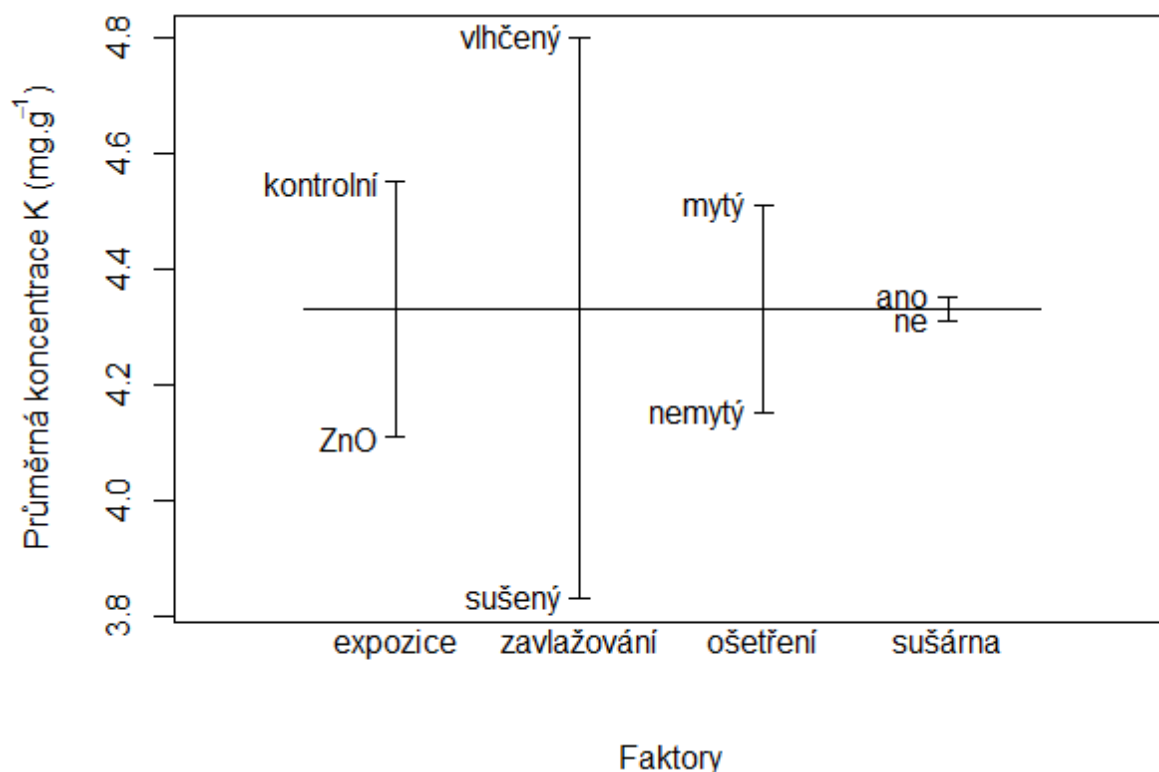
## 7.2. Draslík



Obrázek 9: Koncentrace K ve vzorcích s různou úpravou a v různých částech stélky: a) na povrchu mechu a mezibuněčných prostorách, b) vázaného extracelulárně, c) v buňce, d) získaná celkovým rozkladem zbytkového materiálu

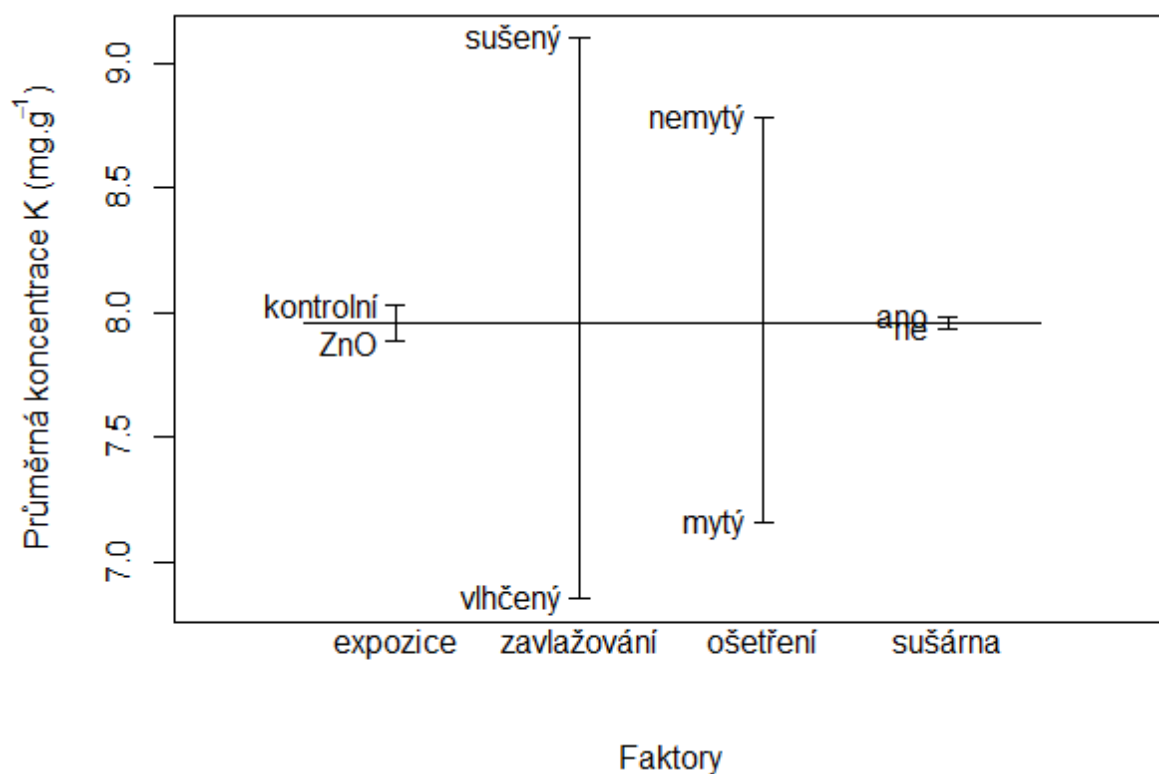
Na povrchu a v intercelulární části stélky mechu (Obr. 9a)) podléhá množství K několika trendům. Povrch a mezibuněčné prostory vzorků, které byly po sběru omyty pod kohoutkovou vodou obsahovaly obecně více K než povrch a mezibuněčné prostory vzorků, které byly v laboratoři pouze mechanicky očištěny a následně podlehly stejné úpravě. Výsledky tedy nebyly ovlivněny externím K (z prachu z okolního prostředí), který mohl být usazen na povrchu mechu. Pokud by byl prach na povrchu mechu podstatným zdrojem draslíku, nemytý mech by vykazoval více draslíku v povrchové frakci, protože u umytého mechu by byl tento K smyt jedním mycím krokem navíc. V povrchové a intercelulární frakci

vykazovaly ve většině případů vlhčené vzorky vyšší koncentraci K než vzorky, které byly před expozicí vysušeny. U vzorků vystavených nanočásticím bylo vně buněk nalezeno méně K než u kontrolních vzorků, tudíž by ZnO nanočástice neměly vést k poškození buněčné membrány. Na rozdíl od povrchové a intercelulární frakce bylo v extracelulární frakci (Obr. 9 b)) více draslíku v sušených vzorcích než ve vlhčených. Dále koncentraci K v extracelulární frakci ovlivňovalo ošetření – nemyté vzorky obsahovaly více K než umyté. Koncentrace K byla opět u vzorků exponovaných nanočásticím ZnO nižší než u kontrolních vzorků. Je možné, že Zn se vázal na extracelulární výměnná místa a vytlačoval tak jiné prvky, včetně K. V buňkách (Obr. 9c)) nemytých vlhčených vzorků bylo méně draslíku, pokud byly vzorky vystaveny nanočásticím, ale u všech ostatních skupin (nemytý sušený, mytý sušený i vlhčený) je tento trend opačný – tedy buňky exponovaných vzorků obsahují K více. Zároveň u většiny skupin platí, že buňky pouze mechanicky očištěných (nemytých) kontrolních vzorků obsahují více K než buňky vzorků, které byly umyté. Nicméně u exponovaných vzorků je to naopak: buňky umytých exponovaných (U-Zn) mechů obsahují více K než buňky nemytých exponovaných (N-Zn) mechů. Ve zbytkové frakci se nalézalo velmi málo K, přibližně 100x méně než v extracelulární frakci, kde bylo K nejvíce a 10x méně než v intracelulární frakci, kde bylo (z předchozích frakcí) K nejméně. Nicméně lze stále z grafu (Obr. 9 d)) vyčíst závislost koncentrace K na různých způsobech úpravy mechového materiálu. Ve zbytkové frakci nemytých vzorků bylo více K než ve zbytkové frakci umytých vzorků. Dále ve zbytkové frakci skupin, které nebyly umyty a byly pravidelně vlhčeny bylo více K v kontrolních vzorcích, ale u ostatních skupin bylo naopak více K v exponovaných vzorcích. Zároveň mělo dopad na množství K ve zbytkové frakci sušení v sušárně, kdy vzorky umístěné do sušárny obsahovaly méně K.



Obrázek 10: Vliv jednotlivých faktorů na průměrnou koncentraci K v povrchové a intercelulární frakci. Úsečky představují rozdíl průměrné koncentrace K mezi vzorky podrobenými jednotlivým úpravám.

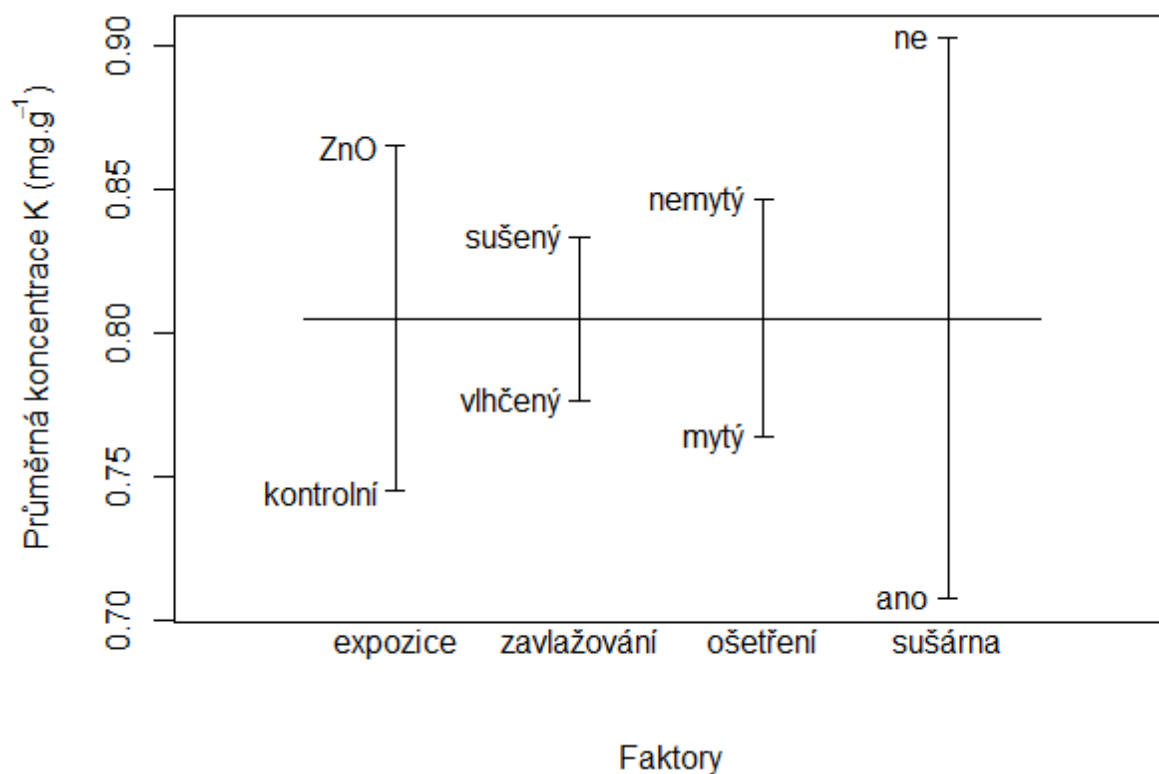
Největší vliv na množství K na povrchu mechu a v mezibuněčných prostorech (Obr. 10) mělo zavlažování, což potvrzuje i analýza variance ( $p = 1,9 \cdot 10^{-6}$ ). Ve vlhčených vzorcích byla koncentrace K přibližně o  $1 \text{ mg.g}^{-1}$  vyšší než v sušených vzorcích. Dalšími významnými faktory ovlivňujícími koncentraci K byla expozice nanočásticím ( $p = 0,009$ ) a ošetření po přinesení do laboratoře ( $p = 0,03$ ). Na povrchu a v mezibuněčných prostorech kontrolních vzorků, které byly vystaveny DEMI vodě, byla zjištěna vyšší koncentrace K než u vzorků vystavených nanočásticím ZnO. U vzorků, které byly umyty se koncentrace K oproti nemytým vzorkům zvýšila.



Obrázek 11: Vliv jednotlivých faktorů na průměrnou koncentraci K v extracelulární frakci. Úsečky představují rozdíl průměrné koncentrace K mezi vzorky podrobenými jednotlivým úpravám.

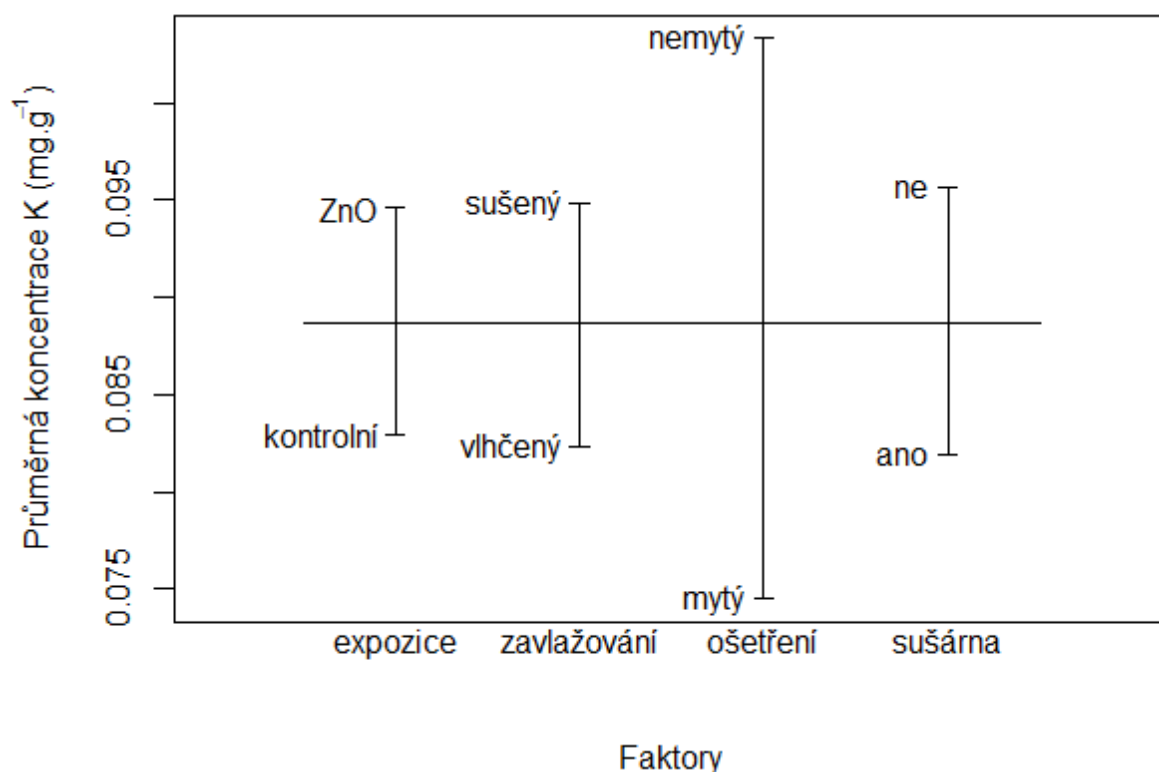
Co se týče dopadu úprav na průměrnou koncentraci K vázaného na buněčné stěně a vnější straně plazmatické membrány (Obr. 11), mělo opět (podobně jako u K vyskytujícího se na povrchu a v mezibuněčných prostorách mechu) největší vliv zavlažování ( $p = 1,2 \cdot 10^{-8}$ ) a ošetření ( $p = 7,2 \cdot 10^{-5}$ ). Trend byl v tomto případě odlišný – koncentrace K byla zvýšená u sušených a umytých vzorků. Zda byly vzorky vystaveny nanočásticím nebo byly po expozici umístěny do sušárny, bylo pro množství K v této frakci nevýznamné.





Obrázek 12: Vliv jednotlivých faktorů na průměrnou koncentraci K v intracelulární frakci. Úsečky představují rozdíl průměrné koncentrace K mezi vzorky podrobenými jednotlivým úpravám.

Největší vliv na koncentraci draslíku v buňce (Obr. 12) mělo umístění mechu do sušárny ( $p = 3,6 \cdot 10^{-6}$ ), kdy buňky vzorků, které byly po expozici ponechány k uschnutí při pokojové teplotě obsahovaly výrazně více K než vzorky sušené v sušárně. To může znamenat, že vlivem teploty 50 °C popraskaly buněčné stěny a došlo k uvolnění intracelulárního draslíku do mezibuněčného prostoru. Analýza variance ukázala, že důležitými faktory jsou také kombinace expozice nanočásticím a ošetření ( $p = 5 \cdot 10^{-5}$ ) a samotná expozice nanočásticím ( $p = 0,0015$ ). Vzorky vystavené nanočásticím ZnO obsahovaly více K v buňce než kontrolní vzorky. Podobně jako extracelulárně vázaný, tak i nitrobuněčný K byl vyšší u vzorků pouze očištěných (nemytých) než u vzorků omytých pod kohoutkovou vodou.



Obrázek 13: Vliv jednotlivých faktorů na průměrnou koncentraci K ve zbytkové frakci. Úsečky představují rozdíl průměrné koncentrace K mezi vzorky podrobenými jednotlivým úpravám.

Vliv na množství K ve frakci získané celkovým rozkladem zbytkového materiálu měly dle analýzy variance všechny faktory. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že se v této frakci nalézalo velmi malé množství draslíku, tudíž se každá změna v koncentraci výrazně projevila. Z nízké koncentrace K ve zbytkové frakci lze také usoudit, že sekvenční extrakce proběhla úspěšně. Největší vliv na koncentraci K v této frakci mělo ošetření ( $p = 4,35 \cdot 10^{-10}$ ), kdy se více K nacházelo u nemytých vzorků (paralelně s extracelulární a intracelulární frakcí). Druhým nejvýznamnějším faktorem bylo umístění mechu do sušárny ( $p = 0,0005$ ), kde závislost opět zůstává stejná jako v buňce – u mechu sušeného v sušárně (po expozici) byl zaznamenán pokles koncentrace K v této frakci oproti mechu schnoucímu při pokojové teplotě. Dále koncentraci K v této frakci ovlivňuje expozice nanočásticím ( $p = 0,003$ ) a zavlažování ( $p = 0,004$ ). Ve zbytkové frakci vzorků exponovaných nanočásticím ZnO bylo zjištěno více K než v kontrolních vzorcích, přičemž sušené vzorky obsahovaly více K než vlhčené.

## 8. Diskuze

Nejvyšší celková koncentrace Zn byla naměřena ve vzorcích s úpravou nemyté vlhčené. Pokud by bylo cílem prováděného biomonitoringu zjistit koncentraci nanočástic v zájmové oblasti bez toho, aniž by byla následně určena lokalizace nanočástic ve stélce

mechorostu, pak by nejvhodnější úpravou mechového materiálu bylo mech po sběru očistit a pravidelně vlhčit vodou, dokud není umístěn do monitorované oblasti. Není vhodné po uplynutí expoziční doby vzorky sušit v sušárně při teplotě 50 °C, protože po tomto procesu byl ve většině vzorků zaznamenán mírný pokles v koncentraci Zn a výsledky biomonitoringu by tak nemusely být přesné. Mechový materiál připravený ostatními způsoby přijímá a akumuluje výrazně méně ZnO nanočástic (o 15–25 %), použití takto připravených vzorků by nemuselo věrohodně odrážet skutečnou koncentraci nanočástic v monitorované oblasti. Ovšem pokud je cílem monitorovacího programu následně určit lokalizaci nanočástice ve stélce monitoru, musí se také přihlédnout k dopadu různých faktorů při přípravě vzorků na celistvost buněčných membrán, která ovlivňuje distribuci nanočástic mezi jednotlivé části stélky mechu. Poškozené buněčné membrány nejsou tak efektivní při bránění průniku cizorodých látek do buňky a naměřená koncentrace v mimobuněčné a nitrobuněčné části stélky by byla zkreslená.

Nejvyšší koncentrace Zn ( $2 \text{ mg.g}^{-1}$ ) byla naměřena v extracelulární frakci – to znamená Zn vázán na buněčné stěně a vnější straně plazmatické membrány. Zároveň se na povrchu stélky a volně v mezibuněčných prostorech nacházelo jen velmi malé množství Zn (nejméně ze všech frakcí, 25x méně než v extracelulární frakci). Nanočástice ZnO tedy s mechem interagují a jsou absorbovány hlouběji do stélky, místo aby se akumulovaly na povrchu fyloidů a kauloidů. Toto chování lze snadno předpokládat, jelikož mechorosty, na rozdíl od cévnatých rostlin, postrádají voskovou kutikulu a nanočástice tedy snadno pronikají do mezibuněčných prostor a interagují s buněčnými stěnami a membránami.

V intracelulární frakci bylo přibližně 2x méně Zn ( $1 \text{ mg.g}^{-1}$ ) než v extracelulární frakci, lze tedy tvrdit, že buněčná stěna a plazmatická membrána jsou relativně efektivní bariéry proti vstupu nanočástic do buňky. V této frakci se objevil zajímavý trend – i v kontrolních vzorcích koncentrace zinku ukazovala závislost, že ve vlhčených vzorcích (M) bylo přítomno více Zn než v sušených (S). Je možné, že zavlažovaný mech (kohoutkovou vodou) obnovil svůj metabolismus a dovnitř buněk absorboval živiny a látky z vody a z prostor vně buněk. Ale u vzorků vystavených nanočásticím ZnO musel být tento faktor doprovázen jiným jevem, protože rozdíl koncentrací Zn v buňce mezi vlhčenými a nevlhčenými vzorky je mnohem vyšší než u kontrolních vzorků. Jednou z možností může být to, že pokud byl mech před expozicí nanočásticím metabolicky aktivní (vlhčený), tak do buňky nanočástice přijímal snadněji než vysušený mech, který musel svůj metabolismus nejdříve obnovit. Také je možné, že zavlažovaný mech utrpěl poškození buněčných membrán, které poté nebyly plně schopny zamezit vstupu cizorodých látek do buňky. Zda

k poškození došlo, lze snadno vyvodit z poměru draslíku vně a uvnitř buňky. U vlhčených vzorků bylo méně K v intracelulární frakci a více K v povrchové frakci a intercelulární frakci než u sušených vzorků, což naznačuje, že zavlažováním mechu došlo k poškození buněčných membrán a draslík, který se běžně vyskytuje především uvnitř buněk v rozpuštěné formě byl vyplaven do mezibuněčných prostor.

Na narušení permeability buněčných membrán mohou mít vliv všechny faktory nebo jejich kombinace. Z hlediska zjištění toxicity nanočástic ZnO patří integrita buněčných membrán u exponovaných vzorků mezi nejdůležitější. V povrchové a extracelulární frakci je koncentrace draslíku u vzorků vystavených nanočásticím menší než u kontrolních vzorků. Paralelně je koncentrace K v intracelulární frakci u exponovaných vzorků větší (kromě nemytých vlhčených, kdy je koncentrace K u exponovaných vzorků menší a u kontrolních vzorků větší). To znamená, že plazmatické membrány utrpěly méně poškození při zalévání suspenzí nanočástic než při zalévání DEMI vodou. Je možné, že kvůli iontovému deficitu, který byl způsoben hydratací pouze DEMI vodou, byl původně intracelulární K přemístěn buněčnými mechanismy z buňky do mezibuněčných prostor a na povrch mechu. Používání demineralizované vody tedy nemusí být pro kontrolní vzorky úplně vhodné. V budoucnu by bylo vhodné zvážit využívání roztoku s obdobnou koncentrací iontů, jaká se vyskytuje např. v dešťových srážkách.

Vliv ošetření a zavlažování na koncentraci K v buňce a s tím spojené porušení celistvosti buněčných membrán se lišil u kontrolních a exponovaných vzorků. Zatímco buňky kontrolních vzorků obsahovaly více K, pokud vzorky nebyly v laboratoři omyty, v intracelulární frakci exponovaných vzorků bylo nalezeno více K v umytých vzorcích (Obr. 9 c)). Nicméně na povrchu stélky a v mezibuněčných prostorech se nacházelo více K v umytých vzorcích (bez závislosti na expozici), což naznačuje, že umytím mechu došlo k popraskání buněčných membrán. Toto tvrzení také podporuje situace uvedená v Obr. 12, ze kterého vyplývá, že průměrná koncentrace K je nižší v umytých vzorcích, tedy buněčné membrány jsou více poškozeny než v nemytých vzorcích. Skutečný vliv omytí mechu na stav plazmatické membrány by měl být ještě blíže prozkoumán samostatně, tzn. bez dalších faktorů, které by výsledky mohly ovlivňovat. Z hlediska příjmu ZnO nanočástic do buňky, nejnižší koncentraci Zn v intracelulární frakci (viz Obr. 3 c)) obsahovaly nemyté sušené vzorky, což je v souladu s tvrzením, že buněčné membrány takto upravených vzorků byly narušeny nejméně, tudíž byly nejefektivnější v obraně před vstupem nanočástic do cytoplazmy. Koncentrace Zn v buňce je mírně vyšší v umytých sušených vzorcích, to naznačuje, že mytí mechu má menší dopad na buněčné membrány než zavlažování. Nejvyšší

intracelulární koncentrace Zn byla naměřena v nemytých vlhčených vzorcích, i když dle předpokladu příjmu nanočástic do buňky na základě stavu buněčných membrán by nejvyšší koncentrace Zn měla být naměřena v umytých vlhčených vzorcích. Intracelulární příjem nanočástic tedy nezávisí pouze na celistvosti buněčných membrán, ale pravděpodobně i na jiných faktorech.

U většiny vzorků podrobených stejné úpravě bylo zaznamenáno snížení koncentrace K ve vzorcích, které byly na konci expozice umístěny do sušárny oproti těm, které do sušárny umístěny nebyly. Tento pokles byl pozorován ve všech frakcích, což může znamenat, že teplota 50 °C způsobila odpaření K společně s vlhkostí. Nicméně v intracelulární frakci je rozdíl koncentrace K mezi vzorky nesusšenými a sušenými v sušárně často velmi výrazný, což naznačuje, že teplotou 50 °C je porušena celistvost buněčných membrán. I když sušení v sušárně nemá příliš velký vliv na celkovou akumulaci Zn v mechu, poškozené buněčné membrány mají vliv na uložení Zn v rostlině, což při determinaci lokalizace nanočástic ve stélce není žádoucí. Není vyloučeno, že nižší teploty (40–30 °C) negativní efekt na buněčné membrány nemají, toto téma se zdá vhodným námětem pro další výzkum.

## 9. Závěr

Celková koncentrace Zn se lišila v závislosti na úpravě mechu druhu *P. schreberi* a pohybovala se mezi 2,9–3,8 mg.g<sup>-1</sup>. V rámci práce nebylo zjišťováno, zda byl Zn v mechu akumulován ve formě nanočástic ZnO, nebo byl chemicky pozměněn. Nejvyšší koncentrace Zn (průměrně 2,2 mg.g<sup>-1</sup>) byla naměřena v extracelulární části mechu, tzn. Zn vázán na buněčné stěně a vnější straně plazmatické membrány. V intracelulární části stélky (uvnitř buněk) byla průměrná koncentrace Zn téměř 1 mg.g<sup>-1</sup>. Nejméně Zn bylo nalezeno na povrchu a volně mezibuněčných prostorech (intercelulární frakce) a ve frakci, která vznikla celkovým rozkladem zbytkového materiálu. V obou frakcích se průměrná koncentrace Zn pohybovala okolo 0,1 mg.g<sup>-1</sup>. Koncentrace akumulovaného Zn byla silně ovlivněna úpravou mechového materiálu před začátkem expozice nanočásticím. Nejvíce Zn bylo absorbováno mechem s úpravou nemytý vlhčený, průměrně 3,8 mg.g<sup>-1</sup>. Koncentrace Zn postupně klesala v umytých sušených (3,5 mg.g<sup>-1</sup>), nemytých sušených (3,2 mg.g<sup>-1</sup>) a umytých vlhčených (2,9 mg.g<sup>-1</sup>) vzorcích. V závislosti na přípravě mechu se lišila i distribuce koncentrace Zn v jednotlivých frakcích.

Pokud je cílem biomonitoringu zjistit míru celkového znečištění nanočásticemi v určité oblasti, je nejvhodnější úpravou nemytí a vlhčení, protože koncentrace

akumulovaného Zn v takto upravených vzorcích byla nejvyšší. V praxi to znamená mech po nasbírání v neznečištěné lokalitě očistit od trávy, jehličí a jiných nečistot a pravidelně jej udržovat vlhký, dokud není umístěn do monitorované oblasti. Pokud je však žádoucí determinovat lokalizaci nanočástic nebo jiných polutantů ve stélce biomonitoru, musí být kladen důraz na neporušenost buněčných membrán, aby získaná data byla reprezentativní. Analýzou rozdělení koncentrace K uvnitř a vně buněk bylo zjištěno, že negativní dopad na stav buněčných membrán má jak omytí mechu po přinesení do laboratoře, tak zavlažování (vlhčení mechu před expozicí). Porušením integrity buněčných membrán je snížena schopnost buňky efektivně bránit vniku cizorodých a potenciálně toxických látek do cytoplazmy. K zachování jejich správné funkce je doporučenou úpravou vzorků mechový materiál pouze mechanicky očistit a nechat jej vyschnutý až do další manipulace. Celková koncentrace Zn byla sice v nemytých sušených vzorcích o 15 % nižší než v nemytých vlhčených, ale permeabilita buněčných membrán by měla zůstat zachována. Také není vhodné mech po uplynutí expoziční doby umisťovat do sušárny na 50 °C, jelikož už i tato teplota způsobuje popraskání buněčných membrán.

## Bibliografie

ASLI, Sare a Peter NEUMANN, 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell*. **32**(5), 577-584. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.01952.x. ISSN 01407791.

BATES, J.W., A. Jonathan SHAW a Bernard GOFFINET. Mineral nutrition, substratum ecology, and pollution. *Bryophyte biology*. New York, N.Y: Cambridge University Press, 2000, s. 248-311. ISBN 9781139171304.

BATES, J., 1979. The relationship between physiological vitality and age in shoot segments of *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. *Journal of Bryology*. **10**(3), 339-351. DOI: 10.1179/jbr.1979.10.3.339. ISSN 0373-6687.

BHATTACHARJEE, Soumen, 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*. **89**(7), 1113-1121.

BIRBAUM, Karin, Robert BROGIOLI, Maya SCHELLENBERG, Enrico MARTINOIA, Wendelin STARK, Detlef GÜNTHER a Ludwig LIMBACH, 2010. No Evidence for Cerium Dioxide Nanoparticle Translocation in Maize Plants. *Environmental Science*. **44**(22), 8718-8723. DOI: 10.1021/es101685f. ISSN 0013-936x.

BRANQUINHO, C a D. BROWN, 1994. A method for studying the cellular location of lead in lichens. *The Lichenologist*. **26**(1), 83-90. DOI: 10.1006/lich.1994.1007. ISSN 00242829.

BROWN, , 1982. Mineral nutrition. BROWN, D.H. *Bryophyte Ecology*. London: Chapman & Hall, s. 383-44.

BRŪMELIS, Guntis, Dennis BROWN, Olgers NIKODEMUS a Didzis TJARVE, 1999. The Monitoring and Risk Assessment of Zn Deposition Around a Metal Smelter in Latvia. *Environmental Monitoring and Assessment*. **58**(2), 201-212. DOI: 10.1023/A:1006085220366. ISSN 01676369.

CANIVET, L., P. DUBOT a F-O. DENAYER. Uptake of iron nanoparticles by *Aphanorrhegma patens* (Hedw.) Lindb. *Journal of Bryology* [online]. 2014, **36**(2), 104-109 [cit. 2016-11-27]. DOI: 10.1179/1743282014Y.0000000102. ISSN 0373-6687.

CANIVET, L., P. DUBOT, G. GARÇON a F.-O. DENAYER, 2015. Effects of engineered iron nanoparticles on the bryophyte, *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. **113**, 499-505 [cit. 2016-11-20]. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.035. ISSN 01476513.

DENG, Ying-qing, Jason C. WHITE a Bao-shan XING, 2014. Interactions between engineered nanomaterials and agricultural crops: implications for food safety. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*. **15**(8), 552-572. DOI: 10.1631/jzus.A1400165. ISSN 1673-565x.

DOHNALOVÁ, Lucie a Vlastimil DOHNAL, 2015. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické listy*. **109**(6), 444-450.

ETXEBERRIA, Ed, Pedro GONZALEZ a Javier POZUETA, 2009. Evidence for two endocytic transport pathways in plant cells. *Plant Science*. **177**(4), 341-348. DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.06.014. ISSN 01689452.

EVROPSKÝ MONITOROVACÍ A HODNOTÍCÍ PROGRAM, , 1979. *Úmluva o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice států*. Ženeva.

FRONTASYEVA, M., E. STEINNES, H. HARMENS, Information on the moss survey in 2015: some preliminary results Proceedings of the 29th Task Force Meeting of the UNECE ICP Vegetation, 29th February–4th March, 2016, Moskva, Rusko (2016)

GLIME, Janice, 2013. *Bryophyte Ecology: Volume 1: Physiological Ecology* [online]. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z: <http://www.bryoecol.mtu.edu/>

HARMENS, H., G. MILLS, F. HAYES, K. SHARPS a M. FRONTASYEVA, 2015. *Air Pollution and Vegetation: ICP Vegetation Annual Report 2014/2015*. 1. Bangor: ICP Vegetation Programme Coordination Centre. ISBN 978-1-906698-55-3.

HERNANDEZ-VIEZCAS, Jose A., Hiram CASTILLO-MICHEL, Joy Cooke ANDREWS. In Situ Synchrotron X-ray Fluorescence Mapping and Speciation of CeO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles in Soil Cultivated Soybean (*Glycine max*). *ACS Nano*. 2013, **7**(2), 1415-1423. DOI: 10.1021/nn305196q. ISSN 1936-0851.

HONG, Jie, Jose PERALTA-VIDEA, Cyren RICO, Shivendra SAHI, Marian VIVEROS, Jane BARTONJO, Lijuan ZHAO a Jorge GARDEA-TORRESDEY, 2014. Evidence of Translocation and Physiological Impacts of Foliar Applied CeO<sub>2</sub> Nanoparticles on Cucumber (*Cucumis sativus*) Plants. *Environmental Science*. **48**(8). DOI: 10.1021/es404931g. ISSN 0013-936x.

KUREPA, Jasmina, Tatjana PAUNESKU, Stefan VOGT et al., 2010. Uptake and Distribution of Ultrasmall Anatase TiO<sub>2</sub> Alizarin Red S Nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Letters*. **10**(7), 2296-2302. DOI: 10.1021/nl903518f. ISSN 1530-6984.

LARUE, Camille, Hiram CASTILLO-MICHEL, Sophie SOBANSKA et al., 2014. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *Journal of Hazardous Materials*. **264**, 98-106. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.10.053. ISSN 03043894.



LARUE, Camille, Julien LAURETTE, Nathalie HERLIN-BOIME, Hicham KHODJA, Barbara FAYARD, Anne-Marie FLANK, François BRISSET a Marie CARRIERE, 2012. Accumulation, translocation and impact of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. *Science of The Total Environment*. **431**, 197-208. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.073. ISSN 00489697.

LARUE, Camille, Giulia VERONESI, Anne-Marie FLANK, Suzy SURBLE, Nathalie HERLIN-BOIME a Marie CARRIÈRE, 2012. Comparative Uptake and Impact of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Wheat and Rapeseed. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. **75**(13-15), 722-734. DOI: 10.1080/15287394.2012.689800. ISSN 1528-7394.

LIN, Daohui a Baoshan XING, 2008. Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environmental Science*. **42**(15), 5580-5585. DOI: 10.1021/es800422x. ISSN 0013-936x.

LÓPEZ-MORENO, Martha L., Guadalupe DE LA ROSA, José Á. HERNÁNDEZ-VIEZCAS, Hiram CASTILLO-MICHEL, Cristian E. BOTEZ, José R. PERALTA-VIDEA a Jorge L. GARDEA-TORRESDEY. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO<sub>2</sub> Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants. *Environmental Science*. 2010, **44**(19), 7315-7320. DOI: 10.1021/es903891g. ISSN 0013-936x.

MAJUMDAR, Sanghamitra, Jose R. PERALTA-VIDEA, Susmita BANDYOPADHYAY, Hiram CASTILLO-MICHEL, Jose-Angel HERNANDEZ-VIEZCAS, Shivendra SAHI a Jorge L. GARDEA-TORRESDEY, 2014. Exposure of cerium oxide nanoparticles to kidney bean shows disturbance in the plant defense mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*. **278**, 279-287. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.06.009. ISSN 03043894.

MARKERT, B., ed., A. BREURE, ed. a Harald ZECHMEISTER, ed., 2003. *Bioindicators & Biomonitors: principles, concepts and applications*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier. Trace metals and other contaminants in the environment, vol. 6. ISBN 00-804-4177-7.

MARKERT, Bernd, 2007. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. **21**, 77-82 [cit. 2016-11-29]. DOI: 10.1016/j.jtemb.2007.09.015. ISSN 0946672x.

MA, Xingmao, Jane GEISER-LEE, Yang DENG a Andrei KOLMAKOV, 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and

accumulation. *Science of The Total Environment*. **408**(16), 3053-3061. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.03.031. ISSN 00489697.

MRÁZKOVÁ, Veronika. *Distribuce a akumulace nanočástic oxidů kovů v mechu*. Ostrava, 2016. Diplomová práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.

MURPHY, Angus, Anindita BANDYOPADHYAY, Susanne HOLSTEIN a Wendy PEER, 2005. Endocytotic Cycling of PM Proteins. *Annual Review of Plant Biology*. **56**(1), 221-251. DOI: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144150. ISSN 1543-5008.

PÉREZ-LLAMAZARES, Alicia, Jesús ABOAL a Alejo FERNÁNDEZ, 2011. Sequential Elution Technique in Moss *Pseudoscleropodium purum*: Comparison between the Commonly Used Extracellular Extractant NiCl<sub>2</sub> and Other New Extractants. *Water, Air, & Soil Pollution*. **215**(1), 561-572. DOI: 10.1007/s11270-010-0499-5. ISSN 0049-6979.

PÉREZ-LLAMAZARES, Alicia, J FERNÁNDEZ, Alejo CARBALLEIRA a Jesús ABOAL, 2011. The sequential elution technique applied to cryptogams: a literature review. *Journal of Bryology*. **33**(4), -. DOI: 10.1179/1743282011Y.0000000010. ISSN 03736687.

PÉREZ-LLAMAZARES, Alicia, Cristóbal GALBÁN-MALAGÓN, Jesús ABOAL, J. ÁNGEL FERNÁNDEZ a Alejo CARBALLEIRA, 2010. Evaluation of cations and chelating agents as extracellular extractants for Cu, Pb, V and Zn in the sequential elution technique applied to the terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **73**(4), 507-514. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.12.019. ISSN 01476513.

R CORE TEAM, 2016. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Dostupné také z: <https://www.R-project.org/>

RICHTER, Rostislav. Mimokořenová výživa rostlin. In: *Multimediální učební texty z výživy rostlin* [online]. Brno: Ústav agrochemie a výživy rostlin, MZLU v Brně, 2003 [cit. 2016-12-31]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/vyziva\\_rostlin/html/prijem\\_zivin/prijem\\_mimokorenovy.htm](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/prijem_zivin/prijem_mimokorenovy.htm)

RICO, Cyren, Sanghamitra MAJUMDAR, Maria DUARTE-GARDEA, Jose PERALTA-VIDEA a Jorge GARDEA-TORRESDEY, 2011. Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**(8), 3485-3498. DOI: 10.1021/jf104517j. ISSN 0021-8561.

SIDDIQUI, Manzer, Firoz MOHAMMAD a Mohamed AL-WHAIBI, 2015. *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants*. 1. Springer. ISBN 978-3-319-14501-3.

SUCHAROVÁ, J. a I. SUCHARA, 1998. Atmospheric deposition levels of chosen elements in the Czech Republic determined in the framework of the International Bryomonitoring Program 1995. *Science of The Total Environment*. **223**(1), 37-52. DOI: 10.1016/S0048-9697(98)00306-4. ISSN 00489697.

SUCHAROVÁ, Julie, Ivan SUCHARA a Marie HOLÁ, 2008. *Obsah 37 prvků v mechu a časové a prostorové změny jeho hodnot v České republice během posledních 15 let: čtvrtý český biomonitorovací průzkum prováděný v rámci mezinárodního programu OSN EHK ICP-Vegetace 12005/2006*. 1. Průhonice: Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví. ISBN 978-80-85116-62-5.

ŠOLTÉS, R. a E. GREGUŠKOVÁ, 2012. Bryomonitoring of element deposition in three valleys in the Tatra Mts (Slovakia) based on X-ray spectrometry. *Oecologia Montana: International Journal of Mountain Ecology*. **21**(1), 15-20.

TRACHTENBERG, S. a E. ZAMSKI, 1978. Conduction of Ionic Solutes and Assimilates in the Leptom of Polytrichum juniperinum Willd. *Journal of Experimental Botany*. **29**(3), 719-727. DOI: 10.1093/jxb/29.3.719. ISSN 0022-0957.

TRČKOVÁ, Marie, Ivana RAIMANOVÁ a Pavel SVOBODA. Listová výživa obilnin: uplatněná certifikovaná metodika. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2009. ISBN 978-80-7427-030-7.

TRIPATHI, Durgesh, Shweta SINGH, Swati SINGH et al., 2017. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*. **110**, 2-12. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.07.030. ISSN 09819428.

VÁŇA, Jiří, 2006. *Obecná bryologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1093-0.

VINTER, Vladimír, 2009. *Rostliny pod mikroskopem: základy anatomie cévnatých rostlin*. 2., dopl. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2223-7.

WANG, Huanhua, Xiaoming KOU, Zhiguo PEI, John XIAO, Xiaoquan SHAN a Baoshan XING, 2010. Physiological effects of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*. **5**(1), 30-42. DOI: 10.3109/17435390.2010.489206. ISSN 1743-5390.

WANG, Wei-Ning, Jagadish TARAFDAR a Pratim BISWAS, 2013. Nanoparticle synthesis and delivery by an aerosol route for watermelon plant foliar uptake. *Journal of Nanoparticle Research*. **15**(1), -. DOI: 10.1007/s11051-013-1417-8. ISSN 1388-0764.

WANG, Zhenyu, Xiaoyan XIE, Jian ZHAO, Xiaoyun LIU, Wenqiang FENG, Jason WHITE a Baoshan XING, 2012. Xylem- and Phloem-Based Transport of CuO Nanoparticles in Maize ( *Zea mays* L.). *Environmental Science & Technology*. **2012**(46), 4434-4441. DOI: 10.1021/es204212z.

WOLTERBEEK, Bert, 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution* [online]. **120**(1), 11-21 [cit. 2016-11-29]. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00124-0. ISSN 02697491.

ZEMAN, Pavel. *Bioakumulace nanočástic oxidů kovů v mechorostech*. Ostrava, 2015. Diplomová práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Mgr. Oldřich Motyka, Ph.D.

ZHANG, Peng, Yuhui MA a Zhiyong ZHANG. Interactions Between Engineered Nanomaterials and Plants: Phytotoxicity, Uptake, Translocation, and Biotransformation. *Nanotechnology and plant sciences*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2015, s. 77-99. ISBN 9783319145013.

ZHANG, Weilan, Yongbo DAN, Honglan SHI a Xingmao MA, 2017. Elucidating the mechanisms for plant uptake and in-planta speciation of cerium in radish (*Raphanus sativus* L.) treated with cerium oxide nanoparticles. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **5**(1), 572-577. DOI: 10.1016/j.jece.2016.12.036. ISSN 22133437.

ZHU, Hao, Jie HAN, John Q. XIAO a Yan JIN. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring*. 2008, 10(6), 713-717. DOI: 10.1039/b805998e. ISSN 1464-0325.